



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112292399 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 201980024528.3

陈国栋 R·Y·黄 E·德雅诺娃

(22) 申请日 2019.04.03

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(30) 优先权数据

11247

62/652,790 2018.04.04 US

代理人 史文静 黄革生

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2020.10.09

C07K 16/28 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

PCT/US2019/025623 2019.04.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/195452 EN 2019.10.10

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 L·S·路 M·J·塞尔比

A·J·科曼 S·德潘德

M·斯里尼瓦桑 J·张 黄海春

权利要求书4页 说明书50页

序列表14页 附图26页

(54) 发明名称

抗CD27抗体及其用途

(57) 摘要

本公开提供了以高亲和力特异性结合CD27的分离抗体。本公开提供了用于治疗罹患癌症的受试者的方法,包括将治疗有效量的抗CD27抗体作为单一疗法联合检查点抑制剂(如抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4抗体)施用于受试者。

1. 一种如通过表面等离子共振 (SPR) 或流式细胞术测量的特异性结合人CD27且没有阻断其CD70配体的结合的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体或其片段:

(a) 以约100nM或更低, 约90nM或更低, 约80nM或更低, 约70nM或更低, 约60nM或更低, 约50nM或更低, 约40nM或更低, 约1nM至约100nM, 约10nM至约70nM, 约10nM至约50nM, 或约40nM至约45nM的 $K_D$ 结合人CD27, 和/或

(b) 在通过抗CD3抗体和抗CD28抗体刺激的幼稚人T细胞中以约0.5nM或更低, 约0.4nM或更低, 约0.3nM或更低, 约0.005nM至约0.5nM, 约0.01nM至约0.4nM, 或约0.02nM至约0.25nM的 $EC_{50}$ 诱导NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导。

2. 一种特异性结合位于大致跨越人CD27的氨基酸残基21-41和52-57的不连续区域内的表位的单克隆抗体或其抗原结合部分, 人CD27的序列如SEQ ID NO:1所示, 如通过氢-氘交换质谱 (HDX-MS) 和/或蛋白质的快速光化学氧化 (FPOP) 表位作图确定的。

3. 一种特异性结合人CD27的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其:

(a) 包括重链可变区 ( $V_H$ ), 其包含如下: 包含具有SEQ ID NO:2所示序列的连续连接的氨基酸的CDR1, 包含具有SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸的CDR2, 和包含具有SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸的CDR3;

(b) 包括轻链可变区 ( $V_L$ ), 其包含如下: 包含具有SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸的CDR1, 包含具有SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸的CDR2, 和包含具有SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸的CDR3;

(c) 包括 $V_H$ , 其包含具有SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸;

(d) 包括 $V_L$ , 其包含具有SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸;

(e) 包括重链, 其包含具有SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸;

(f) 包括轻链, 其包含具有SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸; 和/或

(g) 是指定为BMS-986215的单克隆抗体。

4. 一种特异性结合与权利要求3的单克隆抗体或其抗原结合部分相同的人CD27表位的单克隆抗体或其抗原结合部分。

5. 权利要求1-4任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其具有一个或多个选自以下的特征:

(a) 没有抑制CD70与CD27的结合, 如通过表面等离子体 (SPR) 或流式细胞术测量的;

(b) 没有特异性结合大鼠CD27和/或小鼠CD27, 如通过SPR或流式细胞术测量的;

(c) 没有特异性结合选自CD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITR及其任意组合的一个或多个TNF受体超家族成员;

(d) 在高达10 $\mu$ g/mL的浓度下没有特异性结合的一个或多个人类组织, 其中人类组织选自甲状腺、肺、皮肤、子宫、前列腺、肝、肾、胰腺、肾上腺、垂体、胎盘、睾丸、大脑、小脑、心脏、外周神经及其任意组合;

(e) 能够诱导通过抗CD3抗体和抗CD28抗体刺激的幼稚的或预先激活的人T细胞中的NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导;

(f) 能够在CHO-svCD3-CD32A测定中诱导增殖和/或IFN- $\gamma$ 分泌;

(g) 能够诱导CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞的增殖;

(h) 能够提高葡萄球菌肠毒素B (SEB) 刺激的人外周血单核细胞PBMC的IL-2的释放;

(i) 组合抗程序性死亡-1 (抗PD1) 抗体时能够将IL-2释放提高至少两倍;

(j) 在单核细胞衍生的树突细胞 (MDDC) 和可溶性OKT3存在下能够逆转Treg介导的共培养的CD4<sup>+</sup>应答性T细胞的遏制;和

(k) 能够增强人T细胞的增殖和可溶性CD70对IFN- $\gamma$ 分泌的诱导。

6. 权利要求2-5任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中单克隆抗体或其抗原结合部分以约100nM或更低,约90nM或更低,约80nM或更低,约70nM或更低,约60nM或更低,约50nM或更低,约40nM或更低,约1nM至约100nM,约10nM至约70nM,约10nM至约50nM,或约40nM至约45nM的K<sub>D</sub>结合人CD27。

7. 权利要求1-6任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中单克隆抗体或其抗原结合部分:

(a) 以约0.1nM或更低,约0.09nM或更低,约0.08nM或更低,约0.07nM或更低,约0.06nM或更低,约0.05nM或更低,约0.04nM或更低,约0.01nM至约0.1nM,约0.025nM至约0.075nM,或约0.03nM至约0.06nM的EC<sub>50</sub>结合人T细胞;

(b) 以约0.5nM或更低,约0.4nM或更低,约0.3nM或更低,约0.2nM或更低,约0.1nM或更低,约0.01nM至约0.5nM,约0.025nM至约0.4nM,约0.04nM至约0.3nM,或约0.06至约0.2nM的EC<sub>50</sub>结合食蟹猴T细胞;和/或

(c) 包括其是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的重链恒定区的重链恒定区。

8. 权利要求1-7任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分,其:

(a) 是人抗体或其片段

(b) 是人源化抗体或其片段;

(c) 是嵌合抗体或其片段;

(d) 是人CD27激动剂;

(e) 没有抑制CD70与CD27的结合,如通过SPR或流式细胞术测量的;

(f) 没有特异性结合大鼠CD27和/或小鼠CD27,如通过SPR或流式细胞术测量的;

(g) 没有特异性结合选自CD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITR及其任意组合的一个或多个TNF受体超家族成员;

(h) 在高达10 $\mu$ g/mL的浓度下没有特异性结合的一个或多个人类组织,其中人类组织选自甲状腺、肺、皮肤、子宫、前列腺、肝、肾、胰腺、肾上腺、垂体、胎盘、睾丸、大脑、小脑、心脏、外周神经及其任意组合;

(i) 任选以约0.5nM或更低,约0.4nM或更低,约0.3nM或更低,约0.005nM至约0.5nM,约0.01nM至约0.4nM,或约0.02至约0.25nM的EC<sub>50</sub>,诱导通过抗CD3 Ab和抗CD28抗体刺激的幼稚的或预先激活的人T细胞中的NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导;

(j) 任选以约0.05nM或更低,约0.04nM或更低,约0.03nM或更低,约0.0005nM至约0.05nM,0.0005nM至约0.04nM,约0.0005nM至约0.03nM,约0.001nM至约0.05nM,约0.001nM至约0.04nM,或约0.001nM至约0.03nM的EC<sub>50</sub>,在CHO-svCD3-CD32A测定中诱导增殖和/或IFN- $\gamma$ 分泌;

(k) 任选以约0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.007nM或更低,约0.006nM或更低,约0.005nM或更低,约0.001nM至约0.01nM,约0.002nM至约0.008nM,约0.003nM至约0.007nM,约0.004nM至约0.006nM的EC<sub>50</sub>,诱导CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞的增

殖；

(l) 提高SEB刺激的人PBMC的IL-2释放,任选在交联剂的存在下提高高于约50% ;或任选联合抗PD-1抗体时提高至少约两倍。

(m) 在MDDC和可溶性OKT3存在下逆转Treg介导的共培养的CD4<sup>+</sup>应答性T细胞的遏制,任选至少约70% ;或

(n) 任选以约0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.007nM或更低,约0.006nM或更低,约0.005nM或更低,约0.001nM至约0.01nM,约0.002nM至约0.008nM,或约0.003nM至约0.005nM的EC<sub>50</sub>,增强人T细胞的增殖和可溶性CD70对IFN- $\gamma$ 分泌的诱导,和任选以0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.007nM或更低,约0.001nM至约0.01nM,约0.002nM至约0.008nM,或约0.005nM至约0.007nM的EC<sub>50</sub>增强IFN- $\gamma$ 分泌的诱导。

9. 一种包含权利要求1-8任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分和药学上可接受载体的组合物。

10. 权利要求9的组合物,进一步包括其他抗体或其抗原结合部分,任选其中其他抗体或其抗原结合部分选自抗PD-1抗体、抗程序性死亡配体-1 (PD-L1) 抗体、抗细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4) 抗体、抗淋巴细胞激活基因-3 (LAG-3) 抗体、抗B和T淋巴细胞衰减子 (BTLA) 抗体、抗T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3 (TIM-3) 抗体、抗杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 抗体、抗杀伤细胞凝集素氧受体G1 (KLRG-1) 抗体、抗腺苷A2a受体 (A2aR) 抗体、抗自然杀伤细胞受体2B4 (CD244) 抗体、抗CD160抗体、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT) 抗体、T细胞激活的V-结构域Ig遏制剂 (VISTA) 抗体、纳武单抗、派姆单抗、西米单抗、阿妥珠单抗、德瓦鲁单抗、阿维单抗、指定为BMS-936559的抗体、抗诱导型T细胞共刺激剂 (ICOS) 抗体、抗CD137 (4-1BB) 抗体、抗CD134 (OX40) 抗体、抗CD27抗体、抗糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白 (GITR) 抗体、抗疱疹病毒进入介质 (HVEM) 抗体,及其任意组合。

11. 编码权利要求1-8任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分的分离核酸。

12. 一种用于治疗罹患癌症的受试者的方法,包括将治疗有效量的权利要求1-8任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分或权利要求9或10的药物组合物施用于受试者,使得受试者得到治疗。

13. 一种用于抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法,包括将治疗有效量的权利要求1-8任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分或权利要求9或10的药物组合物施用于受试者,使得受试者中的肿瘤细胞的生长得到抑制。

14. 权利要求12或13的方法,其中所述方法进一步包括将治疗有效量的用于治疗癌症的其他治疗剂施用于受试者,任选其中其他治疗剂是降低免疫系统的抑制,或提高免疫系统的刺激的化合物。

15. 权利要求12-14任一项的方法,其中癌症是实体瘤,或肿瘤细胞是实体瘤的细胞。

16. 权利要求15的方法,其中实体瘤是选自结肠癌、纤维肉瘤、鳞状细胞癌,小细胞肺癌 (SCLC),非小细胞肺癌 (NSCLC),鳞状NSCLC,非鳞状NSCLC,头颈癌,乳腺癌,食道癌,胃癌,胃肠道癌,小肠癌,肝癌,肝细胞癌 (HCC),胰腺癌 (PAC),肾癌,肾细胞癌 (RCC),膀胱癌,尿道癌,输尿管癌,结肠直肠癌 (CRC),结肠癌,肛门区域癌,子宫内膜癌,前列腺癌,神经母细胞瘤,神经胶质瘤,胶质母细胞瘤,生殖细胞肿瘤,小儿肉瘤,鼻窦自然杀伤者,黑色素瘤,皮肤

癌,骨癌,宫颈癌,子宫癌,子宫内膜的癌症、输卵管癌,卵巢癌,宫颈癌,阴道癌,外阴癌,睾丸癌,内分泌系统癌,甲状腺癌,甲状旁腺癌,肾上腺癌,软组织肉瘤,阴茎癌,肾盂癌,中枢神经系统(CNS)肿瘤,原发性CNS淋巴瘤,肿瘤血管生成,脊髓轴肿瘤,脑癌,脑干神经胶质瘤,垂体腺瘤,卡波西肉瘤,表皮样癌,鳞状细胞癌,儿童实体瘤,环境诱发的癌症,病毒相关的癌症,病毒源癌症,晚期癌症,不可切除的癌症,转移性癌症,难治性癌症,复发性癌症,以及其任意组合的癌症。

17. 权利要求12-14任一项的方法,其中癌症是血液系统恶性肿瘤或肿瘤细胞是血液系统恶性肿瘤的细胞。

18. 权利要求17的方法,血液系统恶性肿瘤选自急性淋巴母细胞白血病(ALL),急性粒细胞性白血病(AML),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),慢性髓性白血病(CML)、T细胞淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤(HL),非霍奇金淋巴瘤(NHL),多发性骨髓瘤,阴燃骨髓瘤,意义未定的单克隆丙种球蛋白病(MGUS),晚期、转移性、难治性和/或复发性血液学恶性疾病,以及所述血液学恶性疾病的任何组合的癌症。

19. 一种用于治疗罹患癌症的受试者的药盒,所述药盒包括:

(a) 一个或多个范围从约0.1至约20mg/kg体重的剂量的权利要求1-8任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分或权利要求9或10的药物组合物;和

(b) 在权利要求12-18任一项方法中使用一个或多个剂量的说明。

20. 一种用于治疗罹患癌症的受试者的药盒,所述药盒包括:

(a) 一个或多个范围从约0.1至约20mg/kg体重的剂量的权利要求1-8任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分或权利要求9或10的药物组合物;

(b) 一个或多个剂量的其他治疗剂;和

(c) 在权利要求12-18任一项方法中使用所述剂量的说明。

## 抗CD27抗体及其用途

[0001] 在整个本申请中,在作者姓名和日期或专利号或专利公开号的括号中引用了各种出版物。就在权利要求前的说明书末尾可以找到这些出版物的完整引文。这些出版物的公开内容通过引用以其整体结合到本申请中,以便更全面地描述截至本文所述和要求保护的发明的日期时本领域技术人员已知的现有技术水平。然而,仅在并入的信息与本文明确的公开内容所提供的信息之间不存在冲突的程度上,将这些公开内容通过引用并入本申请中。此外,本文引用的参考文献不应被理解为承认该参考文献是本发明的现有技术。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2018年4月4日提交的美国临时申请No.62/652,790的权益,将其内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0004] 参考通过EFS-网站电子递交的序列表

[0005] 将本申请中通过电子提交的序列表(名称:13107-W0-PCT\_ST25.txt,大小:23,885字节;以及生成日期:2019年4月1日)的内容通过引用以其整体结合到本文中。

### 发明领域

[0006] 本发明涉及特异性结合CD27的单克隆抗体(mAb)和用于治疗受试者癌症的方法,所述方法包括将抗CD27抗体(Ab)作为单一疗法或联合抗癌剂(如免疫检查点抑制剂)和/或某些化疗和放射疗法施用于受试者。

[0007] 发明背景

[0008] 人类癌症具有许多遗传学和表观遗传学改变,产生了可能被免疫系统识别的新抗原(Chakravarthi等,2016)。由T和B淋巴细胞组成的适应性免疫系统具有强大的抗癌潜力,具有应答多种肿瘤抗原的广谱能力和极度灵敏的特异性。此外,免疫系统证明了相当大的可塑性和记忆成分。成功利用适应性免疫系统的所有这些特性使免疫疗法在所有癌症治疗方式中独树一帜。

[0009] 过去的十年已经见证了用于治疗癌症的特异性免疫检查点途径抑制剂的发展(Chen和Mellman,2013;Lesokhin等,2015),包括用于治疗晚期黑色素瘤患者的结合并抑制细胞毒性T淋巴细胞抗原-4的Ab,伊匹单抗(ipilimumab)(YERVOY®)以及如特异性结合PD-1受体并阻断抑制性PD-1/PD-1配体(PD-L1)信号传导途径的纳武单抗(nivolumab)(OPDIVO®)、派姆单抗(pembrolizumab)(KEYTRUDA®)和西米单抗(cemiplimab)-rwlc(LIBTAYO®)这样的Ab(Iwai等,2017)。该途径还可以被特异结合PD-L1的Ab破坏,包括阿妥珠单抗(atezolizumab)(TECENTRIQ®)、德瓦鲁单抗(durvalumab)(IMFINZI®)和阿维单抗(avelumab)(BAVENCIO®)。

[0010] 纳武单抗是一种完全人类免疫球蛋白(Ig)G4(S228P)mAb,其可选择性地防止与PD-1配体PD-L1和PD-L2的相互作用(美国专利No.8,008,449;Wang等,2014),由此阻断针对外来抗原(包括肿瘤)和自身抗原的抗原特异性T细胞应答的下调,并增强对抗这些抗原的免疫应答。纳武单抗最近已获批准用于几种癌症,包括黑色素瘤、肺癌、肾细胞癌、经典霍奇

金淋巴瘤、头颈癌,膀胱上皮癌、MSI-H或dMMR转移性结直肠癌和肝细胞癌,并且目前正在临床上作为其他癌症类型中的单一疗法或结合其他抗癌剂进行评估。但是,只有一小部分患者(通常少于约25%)会得益于检查点抑制剂的治疗,并且现在大量的精力集中于使用检查点抑制剂和其他抗癌剂或疗法的组合来提高免疫疗法的疗效。由于PD-1/PD-L1抑制剂已被证明在治疗多种癌症中是非常成功的,因此它们被认为很可能是免疫肿瘤学中各种未来药物组合的主力,并且正在竞赛研发最有效的药物组合(参见,例如,Mahoney等,2015;Ott等人,2017)。

[0011] CD27,是肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族中的55kDa的I型跨膜蛋白,结合其配体CD70后可共同刺激T细胞激活。在人类中,CD27由幼稚(naïve)的T细胞组成型和专有表达,并在激活的T细胞和B细胞上上调,而CD70(II型跨膜蛋白)的表达受到高度调节,并仅在激活的T细胞、B细胞和树突状细胞(DC)(Wajant,2016)。CD27在幼稚T细胞中的扩增、效应子功能的增强以及T细胞免疫力和应答者T细胞库的产生以及长期维持中起着重要作用(Hendricks等,2000)。CD27缺陷型小鼠表现出T细胞免疫力、对流感病毒的记忆和激活的NK细胞的溶细胞活性的降低(Hendricks等,2000;De Colvenaer等,2011),而CD70缺乏则损害了效应CD8<sup>+</sup>T细胞产生和病毒清除(Munitic等,2013)。CD27在人类外周血中的表达水平高于人类肿瘤,其中Tregs的CD27表达水平高于CD4<sup>+</sup>T细胞。CD27驱动的共刺激降低了CD8<sup>+</sup>T细胞上T细胞受体激活的阈值,并认为能够产生对抗低亲和力抗原的应答,拓宽了功能性T细胞库(van Gisbergen等,2011)。阻断CD27-CD70相互作用降低原发性CD8<sup>+</sup>T细胞应答(Taraban等,2004;Sanchez等,2007),并导致CD8<sup>+</sup>T细胞的记忆降低(Dolfi等,2008)。重要的是,在小鼠淋巴瘤模型中,CD27共刺激的阻断完全消除了抗CD40的治疗反应(French等,2007)。

[0012] CD27在原发性免疫应答的早期产生中起着作用,并且是T细胞免疫力的产生和长期维持所必需的。CD27-CD70结合导致NF- $\kappa$ B和MAPK8/JNK途径的激活。适体蛋白TRAF2和TRAF5已显示出介导从CD27啮合产生的信号传导。缺乏功能性CD27的患者中威胁生命的EBV相关淋巴增生性疾病或持续性EBV病毒血症证明了活性CD27在维持足够的免疫功能中的临床关联的证据(Salzer等,2013;van Montfrans等,2012)。

[0013] CD27激动作用增强的T细胞刺激作用表现为增加的IFN- $\gamma$ 增殖和分泌(Ramakrishna等,2015)。在使用来自黑素瘤患者的外周血单核细胞(PBMC)的离体研究中,CD27激动剂治疗增加了CD8<sup>+</sup>T细胞对黑素瘤抗原的反应,并产生IFN- $\gamma$ (Bullock等,2014)。在非带有肿瘤的小鼠研究中,已显示出通过强迫耗竭的CD8<sup>+</sup>T细胞退出静止状态,CD27激动剂介导的共刺激与共抑制性检查点PD-L1阻断协同作用(Buchan等,2015)。临床前研究表明了抗CD27激动剂治疗抑制实验性肺转移(Roberts等,2010)并抑制同基因肿瘤的生长(French等,2007;Roberts等,2010;He等,2013;Hen等,2013;Sakanishi和Yagita,2010)。CD27激动作用于PD-1阻断还已经显示出可提高在根除TC-1肿瘤中有效的抗原特异性CTL应答(Ahrends等,2016),以及抗人CD27激动剂单克隆抗体(mAb) varlilumab在人CD27转基因小鼠中与PD-L1阻断协同作用以保护对抗淋巴瘤(Buchan等,2018)。Varlilumab与抗PD-1mAb纳武单抗结合正在各种癌症患者中进行临床试验,并且到目前为止,已显示出具有良好的耐受性,并为具有通常对PD-1抑制剂单一疗法有抗药性的肿瘤类型的患者亚组提供了临床活性的初步证据(Sanborn等,2017)。

[0014] 本公开涉及非配体阻断性CD27激动剂抗体 (Ab) 在诱导抗肿瘤免疫性和维持CD70介导的共刺激和激动作用中的评估。本公开内容还涉及非配体阻断性CD27激动剂Ab与检查点阻断疗法的组合对抗肿瘤活性的评估。仍然需要表现出增强抗肿瘤免疫应答的有效激动活性的高亲和力、非配体阻断性抗CD27 Ab。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明涉及特异性结合人CD27 (hCD27) 并且没有阻断其CD70配体的结合的mAb或其抗原结合部分,所述结合如通过表面等离子体共振 (SPR) 或流式细胞术测量的,其中Ab或其片段: (a) 以约100nM或更低,约90nM或更低,约80nM或更低,约70nM或更低,约60nM或更低,约50nM或更低,约40nM或更低,约1nM至约100nM,约10nM至约70nM,约10nM至约50nM,或约40nM至约45nM的 $K_D$ 结合hCD27,和/或 (b) 在通过抗CD3 Ab和抗CD28Ab刺激的幼稚人T细胞中以约0.5nM或更低,约0.4nM或更低,约0.3nM或更低,约0.005nM至约0.5nM,约0.01nM至约0.4nM,或约0.02nM至约0.25nM的 $EC_{50}$ 诱导NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导。

[0017] 本发明涉及特异性结合位于大致跨越hCD27的氨基酸残基21至41和52至57的不连续区域内的表位的mAb或抗原结合部分,所述Hcd27的序列是SEQ ID NO:1,如通过氢-氘交换质谱 (HDX-MS) 和/或蛋白质的快速光化学氧化 (FPOP) 表位作图来确定。

[0018] 本发明涉及特异性结合hCD27的mAb或其抗原结合部分,其包括: (a) 重链可变区 ( $V_H$ ),其包含如下:包含具有SEQ ID NO:2所示序列的连续连接的氨基酸的CDR1,包含具有SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸的CDR2,和包含具有SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸的CDR3;和 (b) 轻链可变区 ( $V_L$ ),其包含如下:包含具有SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸的CDR1,包含具有SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸的CDR2,和包含具有SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸的CDR3。在某些实施方案中, $V_H$ 包含具有SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸。在某些实施方案中, $V_L$ 包含具有SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸。在某些实施方案中,mAb包含重链和轻链,所述重链包含具有SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸,所述轻链包含具有SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸的轻链。在某些实施方案中,mAb是指定为BMS-986215的mAb。

[0019] 本发明涉及特异性结合与以上mAb或其抗原结合部分的任何的mAb或其抗原结合部分基本上相同的hCD27的表位的mAb或其抗原结合部分。本发明进一步涉及与参照Ab或其参照抗原结合部分竞争与hCD27结合的mAb或其抗原结合部分。

[0020] 将以上任何mAb或其抗原结合部分在以下实施方案中称为抗CD27mAb或其抗原结合部分。

[0021] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分具有一个或多个选自以下的特征: (a) 没有抑制CD70与CD27的结合,如通过表面等离子体 (SPR) 或流式细胞术测量的; (b) 没有特异性结合大鼠CD27和/或小鼠CD27,如通过SPR或流式细胞术测量的; (c) 没有特异性结合选自CD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITR及其任意组合的一个或多个TNF受体超家族成员; (d) 在高达10 $\mu$ g/mL的浓度下没有特异性结合一个或多个人类组织,其中人类组织选自甲状腺、肺、皮肤、子宫、前列腺、肝、肾、胰腺、肾上腺、垂体、胎盘、睾丸、大脑、小脑、心脏、外周神经及其任意组合; (e) 能够诱导通过抗CD3 Ab和抗CD28 Ab刺激的幼稚或预先激活的人T细胞中的NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导; (f) 能够在CHO-svCD3-CD32A测定中诱导增殖和/或IFN- $\gamma$ 分泌; (g) 能够诱导CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞的增殖; (h) 能够提高葡萄球菌肠

毒素B (SEB) 刺激的人PBMC的IL-2的释放; (i) 联合抗程序性死亡-1 (抗PD1) Ab时能够将IL-2释放提高至少两倍; (j) 在单核细胞衍生的树突细胞 (MDDC) 和可溶性OKT3存在下能够逆转Treg介导的共培养的CD4<sup>+</sup>应答性T细胞的遏制; 和 (k) 能够增强人T细胞的增殖和可溶性CD70对IFN- $\gamma$ 分泌的诱导。

[0022] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分以约100nM或更低,约90nM或更低,约80nM或更低,约70nM或更低,约60nM或更低,约50nM或更低,约40nM或更低,约1nM至约100nM,约10nM至约70nM,约10nM至约50nM,或约40nM至约45nM的K<sub>D</sub>结合hCD27。

[0023] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分以约0.1nM或更低,约0.09nM或更低,约0.08nM或更低,约0.07nM或更低,约0.06nM或更低,约0.05nM或更低,约0.04nM或更低,约0.01nM至约0.1nM,约0.025nM至约0.075nM,或约0.03nM至约0.06nM的EC<sub>50</sub>结合人T细胞。

[0024] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分以约0.5nM或更低,约0.4nM或更低,约0.3nM或更低,约0.2nM或更低,约0.1nM或更低,约0.01nM至约0.5nM,约0.025nM至约0.4nM,约0.04nM至约0.3nM,或约0.06nM至约0.2nM的EC<sub>50</sub>结合食蟹猴T细胞。

[0025] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分包括其是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的重链恒定区的重链恒定区。在某些优选实施方案中,抗CD27 mAb或其抗原结合部分包括其是人IgG1同种型的重链恒定区的重链恒定区。在其他实施方案中,抗CD27 mAb或其抗原结合部分包括其是人IgG4同种型的重链恒定区的重链恒定区。

[0026] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的全长Ab。

[0027] 在某些实施方案中,任何抗CD27抗原结合部分是Ab片段或单链Ab。在某些实施方案中,Ab片段选自Fab,F(ab')<sub>2</sub>,Fd和Fv片段,单结构域Ab,单链可变区片段(scFv),二价scFv(di-scFv)和双价scFv(bi-scFv),二抗体(diabody),迷你抗,CDR,及其任意组合。

[0028] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分是人Ab或其片段。

[0029] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分是人源化Ab或其片段。

[0030] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分是嵌合Ab或其片段。

[0031] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分是hCD27激动剂。

[0032] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分没有抑制CD70与CD27的结合,如通过SPR或流式细胞术测量的。

[0033] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分没有特异性结合大鼠CD27和/或小鼠CD27,如通过SPR或流式细胞术测量的。

[0034] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分没有特异性结合选自CD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITR及其任意组合的一个或多个TNF受体超家族成员。

[0035] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分在高达10 $\mu$ g/mL的浓度下没有特异性结合的一个或多个人类组织,其中人类组织选自甲状腺、肺、皮肤、子宫、前列腺、肝、肾、胰腺、肾上腺、垂体、胎盘、睾丸、大脑、小脑、心脏、外周神经,及其任意组合。

[0036] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分能够诱导通过抗CD3 Ab和抗CD28 Ab刺激的幼稚或预先激活的人T细胞中的NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导。在某些实施方案中,mAb或其抗原结合部分能够以约0.5nM或更低,约0.4nM或更低,约0.3nM或更低,约0.005nM至约0.5nM,约0.01nM至约0.4nM,或约0.02nM至约0.25nM的EC<sub>50</sub>诱导NF- $\kappa$ B和MAPK

信号传导。

[0037] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分能够在CHO-svCD3-CD32A测定中诱导增殖和/或IFN- $\gamma$ 分泌。在某些实施方案中,mAb或其抗原结合部分以约0.05nM或更低,约0.04nM或更低,约0.03nM或更低,约0.0005nM至约0.05nM,0.0005nM至约0.04nM,约0.0005nM至约0.03nM,约0.001nM至约0.05nM,约0.001nM至约0.04nM,或约0.001nM至约0.03nM的EC<sub>50</sub>诱导增殖和/或IFN- $\gamma$ 分泌。

[0038] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分能够诱导CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞的增殖。在某些实施方案中,mAb或其抗原结合部分能够以约0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.007nM或更低,约0.006nM或更低,约0.005nM或更低,约0.001nM至约0.01nM,约0.002nM至约0.008nM,约0.003nM至约0.007nM,约0.004nM至约0.006nM的EC<sub>50</sub>诱导增殖。

[0039] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分能够提高SEB刺激的人PBMC的IL释放。在某些实施方案中,mAb或其抗原结合部分在交联剂的存在下例如与阴性对照IgG1 mAb相比能够将IL-2释放提高高于约50%。

[0040] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分联合抗PD-1Ab时能够将IL-2释放提高至少约两倍。

[0041] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分在MDDC和可溶性OKT3存在下能够逆转Treg介导的共培养的CD4<sup>+</sup>应答性T细胞的遏制。在某些实施方案中,mAb或其抗原结合部分例如与阴性对照IgG1 mAb相比能够将Treg介导的遏制逆转至少约70%。

[0042] 在某些实施方案中,任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分能够增强人T细胞的增殖和可溶性CD70对IFN- $\gamma$ 分泌的诱导。在某些实施方案中,mAb或其抗原结合部分能够以约0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.007nM或更低,约0.006nM或更低,约0.005nM或更低,约0.001nM至约0.01nM,约0.002nM至约0.008nM,或约0.003nM至约0.005nM的EC<sub>50</sub>增强增殖。在某些实施方案中,mAb或其抗原结合部分能够以0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.007nM或更低,约0.001nM至约0.01nM,约0.002nM至约0.008nM,或约0.005nM至约0.007nM的EC<sub>50</sub>增强IFN- $\gamma$ 分泌的诱导。

[0043] 本发明涉及包括连接治疗剂的任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分的免疫缀合物。在某些实施方案中,治疗剂是细胞毒素。在某些其他实施方案中,治疗剂是放射性同位素。

[0044] 本发明涉及包括连接结合结构域的任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分的双特异性分子,所述结合结构域具有不同于抗CD27 mAb或其抗原结合部分的结合特异性。

[0045] 本发明涉及一种组合物,其包括:(a)任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分;(b)任何免疫缀合物;或(c)任何双特异性分子;和药学上可接受的载体。在某些实施方案中,组合物进一步包括其他Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中,其他Ab或其抗原结合部分选自抗PD-1Ab、抗程序性死亡配体-1(PD-L1)Ab、抗细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)Ab、抗淋巴细胞激活基因-3(LAG-3)Ab、抗B和T淋巴细胞衰减子(BTLA)Ab、抗T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3(TIM-3)Ab、抗杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)Ab、抗杀伤细胞凝集素氧受体G1(KLRG-1)Ab、抗腺苷A2a受体(A2aR)Ab、抗自然杀伤细胞受体2B4(CD244)Ab、抗CD160 Ab、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)Ab、T细胞激活的V-结构域Ig遏制剂(VISTA)Ab、纳武单抗、派姆单抗及其任意组合。在某些实施方案中,其他Ab或其抗原结合部分选自

抗诱导型T细胞共刺激剂 (ICOS) Ab、抗CD137 (4-1BB) Ab、抗CD134 (OX40) Ab、抗糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白 (GITR) Ab、抗疱疹病毒进入介质 (HVEM) Ab, 及其任意组合。

[0046] 本发明涉及编码任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分的分离核酸。

[0047] 本发明涉及包括任何分离核酸的表达载体。

[0048] 本发明涉及包括任何表达载体的宿主细胞。

[0049] 本发明涉及包括人免疫球蛋白重链和轻链转基因的转基因小鼠, 其中小鼠表达任何抗CD27 mAb。

[0050] 本发明涉及从任何转基因小鼠制备的杂交瘤, 其中杂交瘤产生抗CD27mAb。

[0051] 本发明涉及用于制备任何CD27 mAb或其抗原结合部分的方法, 其包括在任何宿主细胞中表达抗CD27 mAb或其抗原结合部分并从宿主细胞分离抗CD27mAb或其抗原结合部分。

[0052] 本发明涉及用于治疗罹患癌症的受试者的方法, 包括将治疗有效量的任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分、任何免疫缀合物、任何双特异性分子或任何药物组合物施用于受试者, 使得受试者得到治疗。

[0053] 本发明涉及用于抑制受试者中的肿瘤细胞生长的方法, 包括将治疗有效量的任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分、任何免疫缀合物、任何双特异性分子或任何药物组合物施用于受试者, 使得受试者中的肿瘤细胞生长得到抑制。

[0054] 在某些实施方案中, 任何用于治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法进一步包括将治疗有效量的用于治疗癌症的其他治疗剂施用于受试者。在某些实施方案中, 其他治疗剂是降低免疫系统的抑制, 或提高免疫系统的刺激的化合物。在某些实施方案中, 其他治疗剂是小分子化合物、大环肽、融合蛋白, 或Ab。在某些实施方案中, 其他治疗剂是特异性结合PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、TIM-3、KIR、KLRG-1、A2aR、CD244、CD160、TIGIT或VISTA的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中, 其他治疗剂是特异性结合ICOS、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)、CD27、GITR或HVEM的激动Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中, 其他治疗剂是特异性结合PD-1或PD-L1、破坏PD-1和PD-L1的相互作用和抑制PD-1/PD-L1信号传导的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中, 其他治疗剂是特异性结合PD-1或PD-L1的拮抗性Ab或其抗原结合部分, 并且是嵌合、人源化或人mAb或其抗原结合部分。在某些实施方案中, 其他治疗剂是特异性结合PD-1并且与纳武单抗交叉竞争与人PD-1结合的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中, 其他治疗剂是特异性结合PD-1的拮抗性Ab或其抗原结合部分, 并且是纳武单抗、派姆单抗或西米单抗。在某些实施方案中, 其他治疗剂是特异性结合PD-L1并与指定为BMS-936559 (W02013/173223) 竞争与人PD-L1结合的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中, 其他治疗剂是特异性结合PD-L1的拮抗性Ab或其抗原结合部分, 并且是阿妥珠单抗、德瓦鲁单抗、阿维单抗, 或指定为BMS-936559 (W02013/173223) 的Ab。

[0055] 在某些实施方案中, 本文公开的任何用于治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法中的癌症是实体瘤或肿瘤细胞是实体瘤的细胞。在某些实施方案中, 实体瘤是结肠癌或纤维肉瘤。在其他实施方案中, 实体瘤是选自鳞状细胞癌, 小细胞肺癌 (SCLC), 非小细胞肺癌 (NSCLC), 鳞状NSCLC, 非鳞状NSCLC, 头颈癌, 头颈鳞状细胞癌 (SCCHN), 乳腺癌, 三阴性乳腺癌 (TNBC), 雄性乳腺癌, 食道癌, 胃癌, 胃肠道癌, 小肠癌, 肝癌, 肝细胞癌 (HCC), 胰腺癌 (PAC), 胰腺导

管腺癌 (PDAC), 肾癌, 肾细胞癌 (RCC), 膀胱癌, 尿道癌, 输尿管癌, 结肠直肠癌 (CRC), 直肠癌, 结肠癌, 肛门区域癌, 子宫内膜癌, 前列腺癌, 转移性去势抗性前列腺癌 (mCRPC), 神经母细胞瘤, 神经胶质瘤, 胶质母细胞瘤, 多形性胶质母细胞瘤 (GBM), 生殖细胞肿瘤, 小儿肉瘤, 鼻窦自然杀伤者, 黑色素瘤, 皮肤癌, 骨癌, 宫颈癌, 子宫 (内膜) 癌, 子宫内膜的癌症、子宫肉瘤, 输卵管癌, 卵巢癌, 宫颈癌, 阴道癌, 外阴癌, 睾丸癌, 内分泌系统癌, 甲状腺癌, 甲状旁腺癌, 肾上腺癌, 软组织肉瘤, 阴茎癌, 肾盂癌, 中枢神经系统 (CNS) 肿瘤, 原发性CNS淋巴瘤, 肿瘤血管生成, 脊髓轴肿瘤, 脑癌, 脑干神经胶质瘤, 垂体腺瘤, 卡波西肉瘤, 表皮样癌, 鳞状细胞癌, 儿童实体瘤, 环境诱发的癌症, 病毒相关的癌症, 病毒源癌症, 晚期癌症, 不可切除的癌症, 转移性癌症, 难治性癌症, 复发性癌症, 以及其任意组合的癌症。

[0056] 在某些实施方案中, 在任何公开的用于治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法中的癌症是血液系统恶性肿瘤或肿瘤细胞是血液系统恶性肿瘤的细胞。在某些实施方案中, 血液系统恶性肿瘤是T细胞淋巴瘤。在某些实施方案中, 血液系统恶性肿瘤选自急性淋巴母细胞白血病 (ALL), 急性粒细胞性白血病 (AML), 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL), 慢性髓性白血病 (CML)、霍奇金淋巴瘤 (HL), 非霍奇金淋巴瘤 (NHL), 多发性骨髓瘤, 阴燃骨髓瘤, 意义未定的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS), 晚期、转移性、难治性和/或复发性血液学恶性疾病, 以及所述血液学恶性疾病的任何组合的癌症。

[0057] 在某些实施方案中, 任何用于治疗或抑制的方法中的受试者是人类。

[0058] 本发明涉及一种用于治疗罹患癌症的受试者的药盒, 所述药盒包括: (a) 一个或多个范围从约0.1至约20mg/kg体重的剂量的任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分、任何免疫缀合物, 任何双特异性分子或任何药物组合物; (b) 在治疗癌症或抑制肿瘤生长的任何方法中使用一个或多个剂量的说明。

[0059] 本发明涉及一种用于治疗罹患癌症的受试者的药盒, 所述药盒包括: (a) 一个或多个范围从约0.1至约20mg/kg体重的剂量的任何抗CD27 mAb或其抗原结合部分、任何免疫缀合物, 任何双特异性分子或任何药物组合物; (b) 一个或多个范围从约200至约1600mg剂量的特异性结合PD-1或PD-L1的任何Ab或其抗原结合部分; (c) 在包括其他治疗剂的任何治疗或抑制方法中使用一个或多个剂量的说明, 其中所述其他治疗剂是特异性结合PD-1或PD-L1的拮抗性Ab或其抗原结合部分。

[0060] 通过以下不应解释为限制的详述和实施例, 本发明的其他特征和优点将变得显而易见。在本申请全文中引用的所有引用的参考文献的内容, 包括科学文章、GenBank条目、专利和专利申请, 均明确引入本文作为参考。

[0061] 附图简述

[0062] 图1 (A) - (B) 显示了流式细胞术分析中Ab与人 (A) 和食蟹猴 (B) T细胞的结合亲和力。图 (A) 中显示了纳摩尔 (nM) 浓度的BMS-986215和1F5人抗CD27 mAb以及人IgG1 (hIgG1) 对照Ab相关的平均荧光强度 (MFI)。(A) 中的“FL2”表示荧光通道2 (FL2) 中的测量。这些图表明了BMS-986215对人和食蟹猴CD27的亲和力比1F5高。

[0063] 图2 (A) - (B) 显示了BMS-986215是一种非配体阻断性抗CD27 mAb。(A) 显示了用10 $\mu$ g/ml人CD70 (hCD70) (CD27的配体) 预处理, 然后用配体阻断性 (B) 或非阻断性 (NB) 抗CD27 Ab (aCD27) 处理的人T细胞的流式细胞术测定的图示。通过标记的抗人IgG Ab (\*, ahIgG) 检测测定中的Ab结合。(B) 显示了其中图 (A) 的测定是用BMS-986215, 配体阻断性1F5和人IgG1

(对照) Ab进行的图。检测到BMS-986215的结合,表明CD70与CD27的结合没有阻断BMS-986215的结合。未检测到配体阻断性1F5 Ab的结合。(C)显示了流式细胞术测定的图示,其中在10 $\mu$ g/ml可溶性人CD70存在下,如(A)中所述的,将人T细胞暴露于Ab。通过标记的抗CD70 Ab(\*, aCD70)检测到了CD70。(D)显示了其中用BMS-986215,配体阻断性1F5和人IgG1(对照) Ab进行(C)测定的图。在递增浓度的BMS-986215的存在下,CD70仍可检测到,表明CD70结合并未被BMS-986215阻断。CD70的结合随着配体阻断性1F5Ab的浓度增加而降低。“MFI”、“hIgG1”和“FL2”与图1所述相同。(B)中的“FL1”表示荧光通道1(FL1)中的测量值。

[0064] 图3(A)-(C)显示了BMS-986215表位作图。(A)显示了从氢/氘交换质谱(HDX-MS)和蛋白质的快速光化学氧化(FPOP)表位作图方法获得的CD27的序列覆盖率。显示的序列是没有SEQ ID NO:1的20个氨基酸信号肽序列的成熟CD27蛋白。(A)中的氨基酸1至172对应于SEQ ID NO:1的氨基酸21至192。(B)显示了HDX-MS数据分析,表明了CD27的N-末端区域(对应于SEQ ID NO:1的氨基酸21-41)显示出对BMS-986215结合的显著保护。(C)显示了CD27的四个肽的FPOP相对保护百分比,其中成熟蛋白的氨基酸32-37(对应于SEQ ID NO:1的氨基酸52-57)具有最高的FPOP保护百分比(75%),并且表明了与Fab相互作用时CD27上的结合表位。

[0065] 图4(A)-(B)显示了就其与Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)的相互作用和T细胞的CD27刺激,配体阻断性抗CD27 Ab(A)和配体非阻断性Ab BMS-986215(B)的作用的示意图。在BMS-986215存在下发生了通过结合配体CD70的T细胞的CD27共同刺激(B),但在配体阻断性Ab存在下没有发生(A)。

[0066] 图5(A)-(C)显示了与1F5相比,BMS-986215在原代T细胞信号转导测定中导致更大的NF- $\kappa$ B信号转导的诱导。图显示了使用所示量( $\mu$ g/ml)的BMS-986215(A),1F5(B)和IgG1对照(C) Ab,基于0、15、30和60分钟处理时间的NF- $\kappa$ B信号强度。

[0067] 图6(A)-(B)显示了与1F5相比,BMS-986215在CD4<sup>+</sup>T细胞和CHO-scCD3-CD32a细胞(表达源自抗CD3 OKT3 mAb的单链抗CD3 scFv Ab和hCD32a-131His(Fc $\gamma$ RIIa)的CHO细胞)的共培养物中导致了更高的T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌的诱导。用图中所示浓度(nM)的BMS-986215、1F5或hIgG1(对照) Ab处理共培养物。(A)显示每分钟计数(CPM)的T细胞增殖和(B)显示治疗后从T细胞分泌的每毫升皮克(pg/ml)的IFN- $\gamma$ 量。

[0068] 图7(A)-(D)显示了与1F5相比,BMS-986215在CHO-scCD3-CD32a细胞和CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆T细胞((A)-(B))或CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>幼稚T细胞((C)-(D))的共培养物中导致了更高的T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌的诱导,T细胞增殖、IFN- $\gamma$ 量和Ab如图6所描述的那样。

[0069] 图8显示了BMS-986215对来自不同供体(供体1和供体2)的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌(pg/ml)的平均诱导倍数大于2.5,所述细胞已经与B细胞共培养,并用不同量(ng/ml)的葡萄球菌肠毒素B(SEB)刺激。刺激的共培养物用BMS-986215或抗钥孔血蓝蛋白Ab, g1F糖型(KLH-g1f)处理。

[0070] 图9(A)-(E)显示了与不含BMS-986215的对照相比,在可溶性交联的BMS-986215存在下,从SEB刺激的人PBMC释放的白细胞介素2(IL-2)增加。在交联剂(抗人Fc $\gamma$  Ab)不存在(图9(A)和(C))或存在(图9(B)、(D)和(E))下,用所示浓度(nM)的可溶性抗人IgG1(hIgG1,对照)、抗人OX40(OX40.21)、1F5或BMS-986215Ab处理SEB刺激的来自三个供体(供体A、B和C)的PBMC。未进行SEB或Ab处理的PBMC(仅细胞)和经SEB但未经Ab处理的PBMC(仅SEB)为对

照。

[0071] 图10(A)-(F)显示了BMS-986215与纳武单抗和伊匹单抗协同作用,以提高SEB刺激的T细胞中的IL-2产生。用所示浓度(nM)的可溶性抗人IgG1(hIgG1,对照)、1F5或BMS-986215抗体单独(CD27)或与纳武单抗(Nivo combo)或伊匹单抗(Ipi combo)组合处理由SEB刺激的来自两个供体(供体A和B)的PBMC。

[0072] 图11(A)-(C)显示了BMS-986215逆转调节性T细胞(Treg)介导的遏制并诱导反应性T细胞(Tresp)的扩增。(A)显示了在MDDC和可溶性抗人CD3mAb,OKT3的存在下,BMS-986215和IgG1(对照)Ab对Treg介导的共培养的CD4<sup>+</sup>Tresp遏制的作用。Treg:Tresp的比率显示在x轴上,而CD4<sup>+</sup>Tresp的增殖百分比显示在y轴上。BMS-986215将遏制逆转超过70%。(B)和(C)显示了在可溶性抗CD28的存在下在涂有OKT3和BMS-986215(.),1F5或抗KLH(KLH)Ab之一的孔中培养Tresp细胞7天后Tresp细胞的数量((B)中的Foxp3<sup>-</sup>事件)和Foxp3<sup>+</sup>Treg细胞的数量((C)中的Foxp3<sup>+</sup>事件)。(C)显示了CD45RA<sup>+</sup>和CD45RO<sup>+</sup>Treg群的细胞数。

[0073] 图12显示了BMS-986215对ADCC活性的适度诱导。(A)和(B)显示了其中将BMS-986215、1F5或IgG1同种型(对照)Ab加入原代自然杀伤(NK)细胞(作为效应细胞)和激活的T细胞(作为靶细胞)的共培养物中的实验,其中效应子与靶标的比率为10:1(n=8)。

[0074] 图13(A)-(D)显示了在不存在Fc $\gamma$ R的情况下BMS-986215在T细胞活化中的激动剂活性以及在可溶性人CD70(shCD70)中的增强作用。(A)显示了在其中人CD4<sup>+</sup>T细胞与CHO-OKT3细胞(表达源自抗CD3 OKT3 mAb的单链抗CD3 scFv Ab的CHO细胞)共培养的测定中配体阻断性抗CD27 Ab(1F5)和非配体阻断性Ab(BMS-986215)的作用示意图。(B)-(E)显示了图,其中(A)的测定是在不添加shCD70((B)和(C))或添加10 $\mu$ g/ml shCD70((D)和(E))的情况下通过用BMS-986215、1F5或hIgG1(对照)Ab处理共培养物来进行的,并分析了T细胞增殖((B)和(D))或IFN- $\gamma$ 分泌((C)和(E))。图13(B)和(C)显示了在不存在Fc $\gamma$ R且没有shCD70的情况下,BMS-986215而非1F5通过增强T细胞增殖(B)和IFN- $\gamma$ 分泌证明了弱激动剂活性。图13(D)和(E)显示了BMS-986215而非1F5增强了可溶性CD70蛋白对人T细胞的激活(增殖和IFN- $\gamma$ 分泌)。

[0075] 图14(A)-(F)显示了抗小鼠CD27 mAb克隆8H5(其是BMS-986215的替代品)在小鼠肿瘤模型中增强了抗PD-1mAb的活性。BALB/c小鼠皮下植入1 $\times$ 10<sup>6</sup>个CT26细胞作为小鼠结肠癌模型,在植入后第6、9和13天,用腹膜内注射如下物质来治疗:10mg/kg的对照小鼠IgG2a和对照小鼠IgG1-D265A同种型mAb的组合(A:对照mIgG2a<sup>+</sup>对照mIgG1,D265A);BMS-986215的抗小鼠CD27(抗mCD27)替代品,命名为mAb 8H5,其格式为小鼠IgG1同种型(B:抗mCD27,8H5,mIgG1);格式为小鼠IgG2a同种型的8H5(C:抗mCD27,8H5,mIgG2a);格式为Fc惰性小鼠IgG1-D265A同种型的抗小鼠PD-1mAb(D:抗mPD-1,mIgG1,D265A);抗mPD-1,mIgG1,D265A和抗mCD27,8H5,mIgG1的组合(E);以及抗mPD-1,mIgG1,D265A和抗mCD27,8H5,mIgG2a(F)的组合。将抗mCD27 mAb的CD27激动作用与PD-1阻断相结合,与单活性剂疗法(图14(B),抗mCD27:22%TGI,0/10TF;图14(D),抗mPD-1:27%TGI,2/10TF)相比,导致了提高的肿瘤生长抑制(TGI)和更多的无肿瘤(TF)小鼠(图14(E):分别为70%TGI,3/10TF)。

[0076] 发明详述

[0077] 本发明涉及特异性结合CD27的mAb和用于治疗患者癌症的方法,其包括将单独的或联合抗癌剂(如免疫检查点抑制剂)抗CD27 Ab施用于患者。

[0078] 术语

[0079] 为了可以更容易地理解本发明的公开内容,首先定义某些术语。如在本申请中使用的,除非本文另有明确规定,否则以下每个术语应具有以下阐述的含义。在整个申请中阐述了附加的定义。

[0080] 应该理解的是,无论在本文中何处用语言“包括/包含”来描述各个方面,都还另外提供了根据“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的类型方面。

[0081] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开相关领域的普通技术人员通常理解的含义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press; 和 Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修订的, 2000, Oxford University Press, 给技术人员提供了本公开中使用的许多术语的通用词典。

[0082] 单位、前缀和符号以其Système International de Unites (SI) 接受的形式表示。数字范围包括定义范围的数字。本文提供的标题不是对本公开的各个方面的限制,其可以作为整体通过参考说明书来获得。因此,通过参考整个说明书更完整地定义了以下紧接着定义的术语。

[0083] “施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任何,将治疗剂或包含治疗剂的组合物物理引入受试者中。治疗性Ab (如抗CD27 Ab和抗-PD-1Ab) 的优选施用途径是静脉内施用。其他施用途径包括肌内、皮下、腹膜内或其他胃肠外施用途径,例如,通过注射或输注。如本文使用的短语“胃肠外施用”表示肠和局部施用以外的其他施用方式。施用也可以例如进行一次、多次和/或在一个或多个延长的时间段内进行。

[0084] “抗体”(Ab)应当包括,不限于,特异性结合抗原并包含由二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白免疫球蛋白(Ig),或其抗原结合部分。每条H链包含重链可变区(在本文缩写为V<sub>H</sub>)和重链恒定区。IgG Ab的重链恒定区包括三个恒定结构域,C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>和C<sub>H3</sub>。每条轻链包含轻链可变区(在本文缩写为V<sub>L</sub>)和轻链恒定区。IgG Ab的轻链恒定区包括一个恒定结构域,C<sub>L</sub>。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区可以进一步细分成超变区,称为互补决定区(CDR),间插着更保守的称为框架区(FR)的区域。每个V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>包括三个CDR和四个FR,以以下顺序从氨基末端排列至羧基末端:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。已经使用多种方法来描述Ab内的CDR结构域,包括Kabat、Chothia、AbM、contact和IMGT定义。Ab的恒定区可以介导IgG与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0085] Ig可以源自任何通常已知的同种型,包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG和IgM。IgG亚类也是本领域技术人员公知的并且包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。“同种型”是指由重链恒定区基因编码的Ab类别或亚类(例如,IgM、IgG1或IgG4)。术语“抗体”包括例如天然产生的和非天然产生的Ab、单克隆和多克隆Ab、嵌合和人源化Ab、人或非人Ab、完全合成的Ab、和单链Ab。非人Ab可以通过重组方法部分或完全人源化的,以降低其在人类中的免疫原性。在没有明确陈述的情况中,并且除非文中另外表示,术语“抗体”还包括上述任一种Ig的抗原结合片段或抗原结合部分,并且包括单价和二价片段或部分,和单链Ab。

[0086] “分离的”Ab是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他Ab的Ab(例如,分离的特

异性结合CD27的Ab基本上不含特异性结合CD27以外的其他抗原的Ab)。然而,分离的特异性结合hCD27的Ab可以与其他抗原具有交叉反应性,所述其他抗原如来自不同物种如食蟹猴的CD27多肽。此外,分离的Ab可以是纯化的使得基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0087] 术语“单克隆”Ab (mAb) 是指非天然产生的单分子组成的Ab分子的制备物,即,一级序列基本相同的Ab分子,并且其呈现出对特定表位的单一结合特异性和亲和性。mAb是分离的Ab的实例。mAb可以通过本领域技术人员已知的杂交瘤、重组、转基因或其他技术来生产。

[0088] “嵌合”Ab是指其中可变区源自一个物种而恒定区源自另一个物种的Ab,如其中可变区源自小鼠Ab而恒定区源自人Ab的Ab。

[0089] “人”mAb (HuMAb) 是指具有其中框架和CDR区都源自人种系免疫球蛋白序列的可变区的mAb。此外,如果Ab含有恒定区,则恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人Ab可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文使用的,术语“人”Ab不意图包括其中源自另一个哺乳动物物种(如小鼠)种系的CDR序列已经嫁接到人框架序列上的Ab。术语“人”Ab和“完全人”Ab同义使用。

[0090] “人源化”mAb是指其中非人mAb的CDR结构域外的一些、大部分或全部氨基酸被相应的源自人免疫球蛋白的氨基酸替代的mAb。在人源化形式的Ab的一个实施方案中,CDR结构域外的一些、大部分或全部氨基酸已经被来自人免疫球蛋白的氨基酸替代,而一个或多个CDR区内的一些、大部分或全部氨基酸是未改变的。氨基酸的小的添加、缺失、插入、取代或修饰是允许的,只要它们没有消除Ab结合特定抗原的能力。“人源化”Ab保留与原始Ab相似的抗原特异性。

[0091] “抗-抗原”Ab是指特异性结合抗原的Ab。例如,抗CD27 Ab是特异性结合CD27的Ab,而抗PD-1Ab是特异性结合PD-1的Ab。如本文使用的,“抗PD-1/抗PD-L1”Ab是用于破坏PD-1/PD-L1信号传导途径的Ab,其可以是抗PD-1Ab或抗PD-L1 Ab。

[0092] Ab的“抗原结合部分”(也称为“抗原结合片段”)是指保留了特异性结合由完整Ab结合的抗原的能力的一个或多个Ab片段。

[0093] “癌症”是指特征在于体内异常细胞不受控制生长的各种各样的疾病。不受调节的细胞分裂和生长导致恶性肿瘤的形成,其侵入相邻组织,并且还可能通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部分。

[0094] “CD27”是指是肿瘤坏死因子受体超家族成员的受体。CD27是T细胞免疫的产生和长期维持所需的,并结合CD70。CD27在大多数成熟的T细胞、记忆性B细胞和一部分自然杀伤细胞上组成性地表达。CD27及其配体CD70的相互作用在以下过程中起着关键作用:1) 通过T细胞上的CD27的共刺激导致效应子能力和记忆的激活、增殖、存活和成熟;2) 通过人B细胞上的CD27的共刺激激活并促进了浆细胞的生成,增殖和免疫球蛋白的产生;3) 通过自然杀伤细胞上的CD27的共刺激诱导了细胞裂解活性。如本文所用的术语“CD27”包括hCD27, hCD27的变体、同工型和物种同系物,以及与hCD27具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCD27序列可以在GenBank登录号No. AAH12160下找到。CD27在各种类型的淋巴瘤和白血病(如慢性淋巴细胞性白血病、套细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤和边缘b区细胞淋巴瘤)中的表达已得到充分证明。

[0095] “细胞毒性T-淋巴细胞抗原-4”(CTLA-4)是指属于CD28家族的免疫抑制受体。

CTLA-4在体内T细胞上专有地表达,并结合两种配体,CD80和CD86(也分别称为B7-1和B7-2)。如本文使用的术语“CTLA-4”包括人CTLA-4(hCTLA-4),hCTLA-4的变体、同工型和物种同系物,以及与hCTLA-4具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCTLA-4序列可以在GenBank登录号No.AAB59385下找到。

[0096] 术语“免疫疗法”是指通过包括诱导、增强、抑制或另外改变免疫应答的方法治疗患有疾病或处于感染疾病或遭受疾病复发的风险中的受试者。

[0097] 受试者的“治疗(treatment)”或“疗法(therapy)”是指是对受试者进行的任何类型的干预或过程,包括将活性剂施用于受试者,目的在于逆转、减轻、缓解、抑制、减缓或防止与疾病相关的症状、并发症或病症,或生物化学指标的发作、进展、发展、严重程度或复发。

[0098] “程序性死亡-1”(PD-1)是指主要在体内之前激活的T细胞上表达的属于CD28家族的免疫抑制受体,并结合两种配体,PD-L1和PD-L2。如本文使用的,术语“PD-1”包括人PD-1(hPD-1),hPD-1的变体、同工型和物种同系物,以及与hPD-1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-1序列可以在GENBANK®登录号No.U64863下找到。

[0099] “程序性死亡配体-1”(PD-L1)是指结合PD-1时下调T细胞激活和细胞因子分泌的PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体之一(另一种配体是PD-L2)。如本文使用的,术语“PD-L1”包括人PD-L1(hPD-L1),hPD-L1的变体、同工型和物种同系物,以及与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-L1序列可以在GENBANK®登录号No.Q9NZQ7下找到。

[0100] “受试者”包括任何人类或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于脊椎动物,如非人灵长类、绵羊、狗和啮齿动物,如小鼠、大鼠和豚鼠。在优选实施方案中,受试者是人类。术语“受试者”和“患者”在本文可互换使用。

[0101] 药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是单独或联合另一种治疗剂使用时保护受试者对抗疾病发作或促进疾病消退的药物或活性剂的任何含量,所述疾病消退通过疾病症状严重程度降低、无疾病症状阶段的频率或持续时间的增加或由于疾病折磨引起的损伤或残疾的预防或减少来证明。此外,关于治疗的术语“有效的”和“有效性”包括药理有效性和生理安全性。药理有效性是指药物促进患者疾病消退(例如,癌症消退)的能力。生理安全性是指可接受的毒性水平,或由药物施用引起的在细胞、器官和/或生物体水平的其他不良生理作用(不良作用)。可以使用熟练的从业人员已知的各种方法来评价治疗剂的效力,如在临床试验阶段中在人受试者中,在预测在人类中的效力的动物模型系统中,或通过在体外测定中测定活性剂的活性。

[0102] 作为肿瘤治疗的实例,治疗有效量的抗癌剂优选相对于未治疗的受试者将细胞生长或肿瘤生长抑制至少约20%,优选至少约40%,更优选至少约60%,甚至更优选至少约80%,并且再更优选约100%。在本发明的优选实施方案中,可以观察到肿瘤消退并且持续至少约30天,更优选至少约60天,或甚至更优选至少约6个月的时间段。尽管对治疗有效性进行了最终测量,但对免疫治疗药物的评估也必须允许“免疫相关”的反应模式。

[0103] “免疫相关”反应模式是指经常在接受免疫治疗剂治疗的癌症患者中观察到的临床反应模式,这些免疫治疗剂通过诱导癌症特异性免疫反应或通过修饰天然免疫过程产生抗肿瘤作用。该反应模式的特征在于有益的治疗效果,之后是肿瘤负荷的最初增加或新病变的出现,这在评估传统化学治疗剂时将被分类为疾病进展,并与药物治疗失败同义。因

此,对免疫治疗剂的正确评估可能需要长期监测这些活性剂对目标疾病的影响。

[0104] 药物的治疗有效量包括预防有效量,其是单独或联合另一种治疗剂施用于处于患病风险的(例如患有前恶性病症的受试者,其处于发展为癌症的风险中)或遭受疾病复发的受试者时,抑制了疾病(例如癌症)的发展或复发的任何药物含量。在优选实施方案中,预防有效量完全防止疾病的发展或复发。“抑制”疾病的发展或复发是指降低疾病的发展或复发的可能性,或完全防止疾病的发展或复发。

[0105] 选择性词(例如,“或”)的使用应当理解为表示选择对象中的任一个、两个或其任意组合。如本文使用的,不定冠词“一个(a)”或“一个(an)”应当理解是指“一个或多个”任何所述的或列举的成分。

[0106] 在本文中使用的术语“和/或”应被视为两个指定的特征或组分中的每个与或不与另一个一起的具体公开。因此,在本文中在诸如“A和/或B”之类的短语中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”,“A或B”,“A”(单独)和“B”(单独)。同样,在诸如“A、B和/或C”的短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下各个方面:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0107] 术语“约”是指对于特定值、组成或特征在可接受误差范围内的数值、组成或特征,如通过本领域普通技术人员所确定的,其将部分取决于怎样测量或测定数值、组成或特征,即,测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约”可以表示1个标准偏差内或大于1个标准偏差内。或者,它可以表示正负20%的范围,更通常是正负10%的范围。在本申请和权利要求中提供特定的值、组成或特性时,除非另有说明,否则应将“约”的含义假定为在对于该特定的值、组成或特征的可接受误差范围内。对于药物施用方案中的给药频率,术语“约每周一次”,“约每两周一次”或本文中使用的任何其他类似的给药间隔术语是指近似数。例如,“约每周一次”可以包括每7天 $\pm$ 1天,即每6天至每8天。“约每两周一次”可以包括每14天 $\pm$ 3天,即每11天到每17天。类似的近似值适用于,例如,约每3周一次,约每4周一次、约每月一次或约每3-6个月或更长一次。

[0108] 术语“基本上相同的”或“实质上相同的”是指两个或更多个数值、组成或特征之间足够高的相似度,使得本领域技术人员认为这些值、组成或特征之间的差异在所测量的属性背景范围内具有很小的或没有生物学和/或统计学显著性。被测量的数值之间的差异可以例如小于约30%,优选地小于约20%,并且更优选地小于约10%。

[0109] 如本文所述的,任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围理解为包括所述范围内的任何整数值,并且合适时,包括其分数(如整数的十分之一和百分之一),除非另外指出。

[0110] 在以下分段中进一步详细地描述本发明的各个方面。

[0111] 抗CD27 mAb

[0112] 在某些方面中,本公开涉及分离的特异性结合hCD27的Ab,特别是mAb,或其抗原结合部分。在某些实施方案中,hCD27的序列如SEQ ID NO:1所示。

[0113] 抗CD27 Ab与CD27的特异性结合

[0114] 本发明的抗CD27 Ab,包括mAb或其抗原结合部分,特异性地结合CD27。

[0115] Ab通常以高亲和力特异性地结合其同源抗原,所述高亲和力通过1 $\mu$ M至10pM或更低的解离常数( $K_D$ )来反映。任何大于约100 $\mu$ M的 $K_D$ 通常被认为是非特异性结合。如本文使用

的,“特异性结合”抗原的IgG Ab是指以高亲和力结合抗原和基本上相同的抗原的Ab,所述高亲和力表示具有约100nM或更低的 $K_D$ ,但不以高亲和力结合无关抗原。如果呈现出与给定抗原高度的序列同一性,例如,如果呈现出与给定抗原的序列至少80%,至少90%,优选至少95%,更优选至少97%,或甚至更优选至少99%序列同一性,则抗原与给定抗原是“基本上相同的”。在一些实施方案中,特异性结合hCD27的Ab还与来自某些灵长类物种(例如,食蟹猴)的CD27抗原具有交叉反应性。在一些实施方案中,特异性结合hCD27的Ab不与来自啮齿动物物种(例如,小鼠和/或大鼠)的CD27抗原,或除了CD27以外的其他抗原(例如,Ax1或PD-1抗原)交叉反应。

[0116] 如本文使用的,术语“ $K_D$ ”旨在是指针对特定Ab-抗原相互作用的解离常数,其获自 $k_{off}$ 与 $k_{on}$ 的比例(即, $k_{off}/k_{on}$ ),并且表示为摩尔浓度(例如,nM)。术语“ $k_{on}$ ”是指Ab与其抗原相互作用结合的结合速率或“on速率”,而术语“ $k_{off}$ ”是指Ab-抗原复合物的解离速率。可以使用本领域非常确定的方法如表面等离子体共振(SPR)或生物层干涉仪(BLI;ForteBio,Fremont,CA),来测定Ab的 $K_D$ 值。通过不同方法确定的单个Ab的 $K_D$ 值可能会发生很大的变化,例如,高达1000倍。因此,在比较不同Ab的 $K_D$ 值时,重要的是使用相同的方法确定这些 $K_D$ 值。在没有明确说明的地方,并且除非上下文另有说明,否则本文公开的Ab结合的 $K_D$ 值是使用BIACORE®生物传感器系统(GE Healthcare,Chicago,IL)通过SPR测定的。

[0117] 在公开的发明的某些实施方案中,抗CD27 mAb或其抗原结合部分以以下 $K_D$ 结合hCD27:约100nM或更低,约95nM或更低,约90nM或更低,约85nM或更低,约80nM或更低,约75nM或更低,约70nM或更低,约65nM或更低,约60nM或更低,约55nM或更低,约50nM或更低,约45nM或更低,约40nM或更低,约1nM至约100nM,约1nM至约70nM,约1nM至约50nM,约1nM至约45nM,约5nM至约100nM,约5nM至约70nM,约5nM至约50nM,约5nM至约45nM,约10nM至约100nM,约10nM至约70nM,约10nM至约50nM,约10nM至约45nM,或约40nM至约45nM。在某些实施方案中,抗CD27 mAb或其抗原结合部分以以下 $K_D$ 结合hCD27:约100nM或更低,约90nM或更低,约80nM或更低,约70nM或更低,约60nM或更低,约50nM或更低,约40nM或更低,约1nM至约100nM,约10nM至约70nM,约10nM至约50nM,或约40nM至约45nM。在某些实施方案中, $K_D$ 在约37°C和/或约25°C。在某些实施方案中,抗CD27 mAb或其抗原结合部分以以下 $K_D$ 结合hCD27:在约37°C和约25°C下,约10nM至约100nM,约10nM至约75nM,约10nM至约50nM,或约10nM至约45nM。在某些实施方案中,抗CD27 mAb或其抗原结合部分以以下 $K_D$ 结合hCD27:在约37°C下,约15nM至约100nM,约15nM至约75nM,约15nM至约50nM,约15nM至约45nM,约20nM至约100nM,约20nM至约75nM,约20nM至约50nM,约20nM至约45nM,约30nM至约100nM,约30nM至约75nM,约30nM至约50nM,约30nM至约45nM,或约40nM至约45nM。在某些实施方案中,抗CD27 mAb或其抗原结合部分以以下 $K_D$ 结合hCD27:在约25°C下,约45nM或更低,约40nM或更低,约35nM或更低,约30nM或更低,约25nM或更低,约20nM或更低,约1nM至约45nM,约1nM至约40nM,约1nM至约30nM,约1nM至约20nM,约5nM至约45nM,约5nM至约40nM,约5nM至约30nM,约5nM至约20nM,约10nM至约45nM,约10nM至约40nM,约10nM至约30nM,或约10nM至约20nM。在一些实施方案中,抗CD27 mAb或其抗原结合部分以以下 $K_D$ 结合hCD27:在约37°C下约41nM至约44nM和/或在约25°C下约13nM至约16nM。

[0118] 抗CD27 Ab与特异性表位的结合

[0119] 各种方法,包括氢/氘交换质谱(HDX-MS)和蛋白质的快速光化学氧化(FPOP),可以

用于探测Ab的结合表位。

[0120] HDX-MS通过监测主链酰胺氢原子的氘交换速率和程度来探测溶液中的蛋白质构象和构象动力学(Huang和Chen,2015;Wei等,2014)。HDX的水平取决于主链酰胺氢原子和蛋白质氢键的溶剂可及性。HDX上的蛋白质质量增加可以通过MS精确测量。这种技术与酶消化配对时,可以解析肽水平的结构特征,能够将表面暴露的肽与折叠在内部的那些肽区分开。通常,进行氘标记和随后的淬灭实验,然后进行酶消化、肽分离和MS分析。

[0121] FPOP是一种互补的蛋白质足迹技术,可通过检测通常由羟基(OH)自由基诱导的氨基酸侧链的氧化水平来表征蛋白质构象(Yan等,2014;Jones等,2011)。侧链氧化的程度取决于氨基酸侧链的溶剂可及性和暴露氨基酸的化学性质。FPOP使用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的激光辐射,通过流动系统进行光化学标记,并通过引入自由基清除剂来防止过度标记,从而将自由基寿命控制在~1μs。氧化的蛋白质随后通过酶消化并通过MS进行分析。在不同条件下,肽氧化水平的变化可用于获得局部构象变化并表征蛋白质界面。

[0122] 在某些实施方案中,本发明的分离的Ab,包括mAb或其抗原结合部分,特异性地结合位于跨越序列为SEQ ID NO:1的hCD27的大致氨基酸残基21至41和52至57的不连续区域内的表位,如通过HDX-MS和/或FPOP表位作图确定的。

[0123] 结构限定的抗CD27 Ab

[0124] 本公开还提供了分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其特异性地结合hCD27并包含在如下V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的每个中的CDR1、CDR2和CDR3结构域:包含具有SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸的V<sub>H</sub>和包含具有SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸的V<sub>L</sub>。

[0125] 已经研发了不同的方法来描述Ab内的CDR结构域。除了广泛使用的Kabat定义,已经使用其他定义,包括寻求解决Kabat定义缺陷的Chothia、AbNum、AbM、contact和IMGT定义。

[0126] Kabat和同事(Wu和Kabat,1970;Kabat等,1983)的方法是基于CDR包括Ab中变化最大的位置,并且因此可以通过比对当时可用的相当有限数量的Ab序列进行鉴定的假设。基于这种比对,Kabat等介绍了一种针对超变区中的残基的编号方案,并确定了哪个位置标记每个CDR的开头和结尾(<http://bioinf.org.uk/abs/simkab.html>)。

[0127] Chothia定义是基于对少量Ab结构的分析,以确定Ab序列与其CDR的结构环区域之间的关系(Chothia等,1987;1989;Al-Lazikani等,1997;<http://bioinf.org.uk/abs/chothia.html>)。确定了FR和CDR的边界,并且后者已经显示出基于CDR和侧翼FR中关键位置上某些残基的存在而采用受限的构象集。所得到的Chothia编号方案几乎与Kabat方案相同,但是基于结构的考虑,将插入放置在V<sub>L</sub> CDR1和V<sub>H</sub> CDR1中的不同位置。随着更多实验数据的获得,CDR的边界一直在进行重新分析和重新定义。Abhinandan和Martin(2008)在结构背景下分析了Ab序列比对,并发现了手动注释的Kabat数据库中大约10%的序列包含错误或不一致。他们提出了Chothia方案的校正版本,其在结构上校正了整个CDR和框架,并开发了适用于Kabat、Chothia和改进的Chothia编号的,以自动且可靠的方式进行的软件工具(AbNum;可从<http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/>获得)。另一种方法,即AbM定义,代表了Kabat和Chothia定义之间的折衷,并通过Oxford Molecular Group's AbM Ab建模软件来使用([http://www.bioinf.org.uk/abs/](http://www.bioinf.org.uk/abs;);Martin等,1989)。

[0128] contact定义是基于对Protein Data Bank(<http://bioinf.org.uk/abs/>;

MacCallum等,1996)中可用的复杂晶体结构中Ab和抗原之间的接触的分析。

[0129] 定义CDR的最新尝试是IMGT数据库的(Lefranc等(2003;<http://www.imgt.org>)),其收集有关Ig、T细胞受体(TcR)和主要组织相容性复合物(MHC)分子的核苷酸序列信息。它基于比对5000多个Ig和TcR可变区序列,提出了一个统一的用于Ig和TcR序列的编号系统。

[0130] 尽管是在没有可用的关于Ab的结构信息时开发出来的,但Kabat定义是最常用的预测CDR结构域的方法。在没有明确说明的情况下,并且除非上下文另有说明,否则本文公开的CDR已经使用Kabat定义进行了鉴定(参见表2)。因此,本公开提供了特异性结合hCD27的分离Ab,优选mAb或其抗原结合部分,其包括六个CDR的组,其中至少一个对应于表2中所示的CDR序列。在某些实施方案中,本公开提供了特异性结合hCD27的分离Ab,优选mAb或其抗原结合部分,其包含表2所示的所有三个重链可变区(V<sub>H</sub>) CDR序列。在某些实施方案中,本公开提供了特异性结合hCD27的分离Ab,优选mAb或其抗原结合部分,其包含表2所示的所有三个轻链可变区(V<sub>L</sub>) CDR序列。

[0131] 在某些实施方案中,本公开提供了特异性结合hCD27的分离Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其包括:

[0132] (a) V<sub>H</sub>,所述V<sub>H</sub>包括CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包括具有SEQ ID NO:2所示序列的连续连接的氨基酸,CDR2包括具有SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸和CDR3包括具有SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸;和

[0133] (b) V<sub>L</sub>,所述V<sub>L</sub>包括CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包括具有SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸,CDR2包括具有SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸和CDR3包括具有SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸。

[0134] 在某些实施方案中,V<sub>H</sub>包括具有SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸。

[0135] 在某些实施方案中,V<sub>L</sub>包括具有SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸。

[0136] 在某些实施方案中,Ab,优选mAb,包括重链和轻链,所述重链包括具有SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸,轻链包括具有SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸。

[0137] 在某些实施方案中,Ab是指定为BMS-986215的mAb。

[0138] 包括具有与上述任何抗CD27 Ab的氨基酸序列为高度相似或同源的氨基酸序列的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区的并保留了这些Ab的功能特性的抗CD27 Ab也适用于本发明方法中。例如,合适的Ab包括包含V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区的mAb,所述V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区各自包括具有各自与SEQ ID No.8和/或9所示的氨基酸序列为至少80%相同的序列的连续连接的氨基酸。在其他实施方案中,例如,V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>氨基酸序列分别呈现出与SEQ ID No.8和/或9所示序列至少85%,优选至少90%,更优选至少95%,或99%同一性。如本文使用的,两个氨基酸序列之间的序列同一性百分比是序列共享的相同的位置数相对于比较序列长度的函数(即,%同一性=相同的位置数/比较的位置总数×100),考虑任何缺口的数量和每个此类缺口的长度,所述缺口被引入以最大化两个序列之间的序列同一性。可以使用本领域普通技术人员已知的数学算法来完成序列的比较和两个序列之间的同一性百分比的确定。

[0139] 在某些实施方案中,分离的抗CD27 Ab或其抗原结合部分包括其是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的重链恒定区的重链恒定区。在某些优选的实施方案中,分离的抗CD27 Ab或其抗原结合部分是人IgG1同种型的。在其他实施方案中,分离的抗CD27 Ab或其抗原结

合部分是人IgG4同种型的。在某些实施方案中,分离的抗CD27 Ab是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的全长Ab。在某些优选的实施方案中,全长Ab是IgG1同种型的。在更多实施方案中,全长Ab是IgG4同种型的。

[0140] 与参照Ab交叉竞争CD27结合的抗CD27 mAb

[0141] 所公开的发明的范围内还包括分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其特异性地结合CD27,例如,hCD27和/或食蟹猴CD27(cCD27),并且与参照Ab或其参照抗原结合部分交叉竞争与CD27的结合。Ab“交叉竞争”结合抗原(例如CD27)配对的能力表明了第一Ab结合与第二Ab基本上相同的抗原表位区,并且在空间上阻碍了第二Ab与该特定表位区的结合,并且反之,第二Ab结合与第一Ab基本上相同的抗原表位区,并且在空间上阻碍第一Ab与该表位区的结合。因此,测试Ab竞争性地抑制例如mAb BMS-986215与hCD27结合的能力证明了测试Ab结合与mAb BMS-986215基本上相同的hCD27表位区。

[0142] 如果第一Ab将第二Ab与抗原的结合降低至少约40%,则认为第一Ab结合与第二Ab“基本上相同的表位”。优选,第一Ab将第二Ab与抗原的结合降低超过约50%(例如,至少约60%或至少约70%)。在更优选的实施方案中,第一Ab将第二Ab与抗原的结合降低超过约70%(例如,至少约80%,至少约90%,或约100%)。第一和第二Ab的顺序可以颠倒,即,“第二”Ab可以首先结合表面,而随后在“第二”Ab存在下,将“第一”Ab接触表面。如果观察到与抗原结合的竞争性降低,就认为Ab是“交叉竞争”,与Ab加入固定化抗原中的顺序无关。

[0143] 通过结合基本上相同的抗原(如CD27受体)表位区,预期交叉竞争Ab具有与参照Ab的性质非常相似的功能性质。交叉竞争的程度越高,功能性质将越相似。例如,如果各自将另一个与表位的结合抑制至少约80%,则预期两个交叉竞争Ab具有基本上相同的功能性质。如果交叉竞争Ab呈现出相似的结合表位的亲和力(如通过解离常数( $K_D$ )测量的),则预期这种功能相似性甚至更接近。

[0144] 可以使用重组抗原分子或细胞表面表达的抗原分子,基于在标准抗原结合测定(包括BIACORE®分析、ELISA测定或流式细胞术)中可检测地竞争的能力,很容易地鉴定出交叉竞争抗抗原Ab。例如,鉴定测试Ab是否与BMS-986215竞争与hCD27结合的简单竞争测定法可以涉及:(1)测量以饱和浓度施用的BMS-986215与其上固定了hCD27的BIACORE®芯片(或其他对于SPR分析合适的介质)的结合,和(2)测量BMS-986215与先前已结合了测试Ab的hCD27包被的BIACORE®芯片(或其他合适的介质)的结合。比较在存在和不存在测试Ab的情况下BMS-986215与CD27包被的表面的结合。在存在测试Ab的情况下,显著降低(例如,超过约40%)的BMS-986215结合表明两种抗体都识别基本上相同的表位,从而它们竞争与CD27靶的结合。第一Ab与抗原的结合被第二Ab抑制的百分比可以计算为: $[1 - (\text{检测到的第二Ab存在时第一Ab的结合}) / (\text{检测到的第二Ab不存在时第一Ab的结合})] \times 100$ 。为了确定Ab是否交叉竞争,重复竞争性结合测定,除了在存在BMS-986215的情况下测量测试Ab与CD27包被的芯片的结合。

[0145] 在一些方面中,本公开涉及分离的Ab,特别是mAb或其抗原结合部分,其特异性地结合与本文公开的任何抗CD27 Ab相同的hCD27表位。

[0146] 抗CD27 mAb的特征

[0147] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,具有一个或多个如本文所述的特征。

[0148] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,是hCD27激动剂。

[0149] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,特异性地结合CD27,例如,hCD27,并且没有阻断其CD70配体的结合,如通过表面等离子体共振 (SPR) 或流式细胞术测量的(即,没有抑制CD70与CD27的结合,如通过SPR或流式细胞术测量的)。这样的mAb或其抗原结合部分在本文中可互换称为非配体阻断性mAb或其抗原结合部分,配体非阻断性mAb或其抗原结合片段,或配体非阻断剂。

[0150] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,没有特异性地结合大鼠CD27和/或小鼠CD27,如通过SPR或流式细胞术测量的。

[0151] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,没有特异性地结合选自CD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITR及其任意组合的一个或多个TNF受体超家族成员。

[0152] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,在高达10 $\mu$ g/mL的浓度下,没有特异性地结合一个或多个人类组织,其中人类组织选自甲状腺、肺、皮肤、子宫、前列腺、肝、肾、胰腺、肾上腺、垂体、胎盘、睾丸、大脑、小脑、心脏、外周神经,及其任意组合。

[0153] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,在通过抗CD3 Ab和抗CD28 Ab刺激的幼稚和预先激活的人T细胞中诱导NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以以下EC<sub>50</sub>在通过抗CD3 Ab和抗CD28 Ab刺激的幼稚和预先激活的人T细胞中诱导NF- $\kappa$ B和/或MAPK信号传导:约0.5nM或更低,约0.45nM或更低,约0.4nM或更低,约0.35nM或更低,约0.3nM或更低,约0.25nM或更低,约0.2nM或更低,约0.005nM至约0.5nM,约0.005nM至约0.4nM,约0.005nM至约0.3nM,约0.005nM至约0.25nM,约0.005nM至约0.2nM,约0.01nM至约0.5nM,约0.01nM至约0.4nM,约0.01nM至约0.3nM,约0.01nM至约0.25nM,约0.01nM至约0.2nM,约0.015nM至约0.5nM,约0.015nM至约0.4nM,约0.015nM至约0.3nM,约0.015nM至约0.25nM,约0.015nM至约0.2nM,约0.02nM至约0.5nM,约0.02nM至约0.4nM,约0.02nM至约0.3nM,约0.02nM至约0.25nM,或约0.02nM至约0.23nM。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以以下EC<sub>50</sub>诱导NF- $\kappa$ B和/或MAPK信号传导:约0.5nM或更低,约0.4nM或更低,约0.3nM或更低,约0.005nM至约0.5nM,约0.01nM至约0.4nM,或约0.015至约0.3nM。

[0154] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,在CHO-svCD3-CD32A测定中诱导增殖和/或IFN- $\gamma$ 分泌。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以以下EC<sub>50</sub>在CHO-svCD3-CD32A测定中诱导增殖和/或IFN- $\gamma$ 分泌:约0.05nM或更低,约0.045nM或更低,约0.04nM或更低,约0.035nM或更低,约0.03nM或更低,约0.025nM或更低,约0.02nM或更低,约0.015nM或更低,约0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.0005nM至约0.05nM,约0.0005nM至约0.04nM,约0.0005nM至约0.03nM,约0.0005nM至约0.02nM,约0.0005nM至约0.01nM,约0.0005nM至约0.009nM,约0.0005nM至约0.008nM,约0.001nM至约0.05nM,约0.001nM至约0.04nM,约0.001nM至约0.03nM,约0.001nM至约0.02nM,约0.001nM至约0.01nM,约0.001nM至约0.009nM,或约0.001nM至约0.008nM。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以

以下EC<sub>50</sub>在CHO-svCD3-CD32A测定中诱导增殖和/或IFN- $\gamma$ 分泌:约0.05nM或更低,约0.04nM或更低,约0.03nM或更低,约0.025nM或更低,约0.0005nM至约0.05nM,约0.0005nM至约0.04nM,约0.0005nM至约0.03nM,约0.001nM至约0.05nM,约0.001nM至约0.04nM,或约0.001nM至约0.03nM。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以约0.009nM的平均EC<sub>50</sub>在CHO-svCD3-CD32A测定中诱导增殖。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以约0.008nM的平均EC<sub>50</sub>在CHO-svCD3-CD32A测定中诱导IFN- $\gamma$ 分泌。

[0155] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,诱导CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞的增殖。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以以下EC<sub>50</sub>诱导CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞的增殖:约0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.007nM或更低,约0.006nM或更低,约0.005nM或更低,约0.001nM至约0.01nM,约0.002nM至约0.008nM,约0.003nM至约0.007nM,或约0.004nM至约0.006nM。

[0156] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,诱导CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞中的IFN- $\gamma$ 分泌。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以以下EC<sub>50</sub>诱导CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞中的IFN- $\gamma$ 分泌:约0.05nM或更低,约0.04nM或更低,约0.03nM或更低,约0.02nM或更低,约0.005nM至约0.05nM,约0.005nM至约0.04nM,约0.005nM至约0.03nM,约0.005nM至约0.02nM,约0.01nM至约0.05nM,约0.01nM至约0.04nM,约0.01nM至约0.03nM,或约0.01nM至约0.02nM。

[0157] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,提高葡萄球菌肠毒素B(SEB)刺激的人PBMC的IL-2释放。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,在交联剂存在下,将SEB刺激的人PBMC的IL-2释放提高高于约50%。在某些实施方案中,与阴性对照IgG1mAb(例如,阴性对照hIgG1 mAb)相比,IL-2释放的百分比提高。在某些实施方案中,倍数增加是在约1nM至约10nM的Ab浓度下。

[0158] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,联合抗PD-1Ab时,将IL-2释放提高了至少约两倍。在某些实施方案中,倍数增加是与不存在抗PD-1Ab情况下的mAb或其抗原结合部分进行比较的。

[0159] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,在MDDC和可溶性OKT3存在下,逆转了Treg介导的共培养的CD4<sup>+</sup>应答T细胞的遏制。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,在MDDC和可溶性OKT3存在下,将Treg介导的共培养的CD4<sup>+</sup>应答T细胞的遏制逆转至少约70%。在某些实施方案中,Treg介导的遏制被逆转的百分比是与阴性对照IgG1 mAb(例如,阴性对照hIgG1mAb)进行比较的。

[0160] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,增强人T细胞的增殖和可溶性CD70对IFN- $\gamma$ 分泌的诱导。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以以下EC<sub>50</sub>增强人T细胞的增殖和可溶性CD70对IFN- $\gamma$ 分泌的诱导:约0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.007nM或更低,约0.006nM或更低,约0.005nM或更低,约0.001nM至约0.01nM,约0.002nM至约0.008nM,或约0.003nM至约0.005nM和/或以以下EC<sub>50</sub>增强IFN- $\gamma$ 分泌的诱导:约0.01nM或更低,约0.009nM或更低,约0.008nM或更低,约0.007nM或更低,约0.001nM至约0.01nM,约0.002nM至约0.008nM,或约0.005nM至约0.007nM。

[0161] 在某些实施方案中,与阴性对照Ab和/或不同的抗CD27 Ab相比,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,具有不同的特征。在某些实施方案中,阴性对照Ab是hIgG1 Ab。在某些实施方案中,不同的抗CD27抗体是1F5,其是具有分别如表5中所示的SEQ ID NO:20和21所示的重链和轻链序列的抗hCD27 mAb。在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,呈现出一个或多个与已知的抗CD27 Ab相比显著优越和/或治疗上有利的特征。例如,在某些实施方案中,与阴性对照Ab和/或不同的抗CD27 Ab相比,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分:对hCD27和/或cCD27具有更高的亲和力,如通过例如K<sub>D</sub>或EC<sub>50</sub>值所示;是hCD27和/或cCD27激动剂;是配体非阻断剂;没有特异性地结合大鼠CD27和/或小鼠CD27,如通过SPR或流式细胞术测量的;没有特异性地结合选自CD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITR及其任何组合的一个或多个TNF受体超家族成员;在高达10μg/mL的浓度下,没有特异性地结合一个或多个人类组织,其中人类组织选自甲状腺、肺、皮肤、子宫、前列腺、肝、肾、胰腺、肾上腺、垂体、胎盘、睾丸、大脑、小脑、心脏、外周神经及其任意组合;引起抗CD3 Ab和抗CD28 Ab刺激的幼稚的或预先激活的人T细胞中的NF-κB和MAPK信号传导的更高诱导;引起CHO-svCD3-CD32A测定中增殖和/或IFN-γ分泌的更高诱导;引起CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞增殖的更高诱导;引起CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞中IFN-γ分泌的更高诱导;引起葡萄球菌肠毒素B (SEB) 刺激的人PBMC的IL释放的更高增加;在MDDC和可溶性OKT3存在下引起Treg介导的共培养的CD4<sup>+</sup>应答T细胞遏制的更高逆转;增强,或以更高水平增强人T细胞的增殖和可溶性CD70对IFN-γ分泌的诱导;在体外和/或体内抑制肿瘤细胞和/或肿瘤生长中具有更高的效力;及其任意组合。

[0162] 抗CD27 Ab与T细胞的结合

[0163] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以以下EC<sub>50</sub>结合人T细胞:约0.1nM或更低,约0.09nM或更低,约0.08nM或更低,约0.07nM或更低,约0.06nM或更低,约0.05nM或更低,约0.04nM或更低,约0.01nM至约0.1nM,约0.015nM至约0.09nM,或约0.02nM至约0.08nM。

[0164] 在某些实施方案中,本发明的分离Ab,包括mAb或其抗原结合部分,以以下EC<sub>50</sub>结合食蟹猴T细胞:约0.5nM或更低,约0.4nM或更低,约0.3nM或更低,约0.2nM或更低,约0.1nM或更低,约0.01nM至约0.5nM,约0.02nM至约0.4nM,或约0.03至约0.3nM。

[0165] 抗CD27 Ab的功能性抗原结合部分

[0166] 本公开提供的抗CD27 Ab除了全长Ab还包括抗原结合片段。已经充分证明了Ab的抗原结合功能可以通过全长Ab的片段来执行。术语Ab的“抗原结合部分”内涵盖的结合片段的实例包括:(i) Fab片段,由V<sub>L</sub>,V<sub>H</sub>,C<sub>L</sub>和C<sub>H1</sub>结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段组成的二价片段;(iii) 由V<sub>H</sub>和C<sub>H1</sub>结构域组成的Fd片段;(iv) 由Ab单臂的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域组成的Fv片段;(v) 单结构域Ab(sdAb)或纳米抗体,由Ab的单个单体可变结构域组成。除常规Ab外,骆驼科动物(如骆驼、羊驼和美洲驼)和软骨鱼类(如鲨鱼和鳐)还包含由重链同型二聚体组成的重链Ab(hcAb)的子集,所述重链同型二聚体包含三个CDR,但缺乏轻链。第一种sdAb最初是从骆驼科动物(这些被称为V<sub>H</sub>H片段)或软骨鱼(V<sub>NAR</sub>片段)中发现的hcAb工程化而成的,但也可以通过从常规Ab通过分裂二聚可变结构域来产生。除衍生自重链可变结构域的sdAb外,衍生自轻链的纳米抗体也已显示出选择性地结合特定的抗原。

[0167] Ab片段,最初通过用酶(如木瓜蛋白酶和胃蛋白酶)的蛋白水解获得,随后工程化成本价和多价抗原结合片段。例如,尽管Fv片段的两个结构域, $V_L$ 和 $V_H$ ,通过分开的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成的接头肽连接在一起,所述合成的接头肽能够使它们制成单个蛋白链,其中 $V_L$ 和 $V_H$ 区配对形成称为单链可变片段(scFv)的单价分子。可以通过连接单个肽链内的两个scFv来工程化二价或双价scFv(di-scFv或bi-scFv),称为串联scFv,其含有两个 $V_H$ 和两个 $V_L$ 区。可以使用少于10个氨基酸的接头肽来形成scFv二聚体和高阶多聚体,少于10个氨基酸的肽接头对于两个可变区折叠在一起太短,这迫使scFv二聚化并产生二抗体(diabody)或形成其他多聚体。双链抗体已经显示出以高于相应scFv高得多的亲和力结合其同源抗原,解离常数比scFv的 $K_D$ 值低40倍。非常短的接头( $\leq 3$ 氨基酸)导致三价三链抗体(triobody)或四价四链抗体(tetrabody)的形成,其呈现出比双抗更高的针对其抗原的亲和力。其他变体包括微型抗(minibodies),其是scFv-CH<sub>3</sub>二聚体,和较大的scFv-Fc片段(scFv-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>二聚体),并且甚至分离的CDR可以呈现出抗原结合功能。使用本领域技术人员已知的常规重组技术对这些Ab片段工程化,并针对实用性以与完整Ab相同的方式来筛选片段。Ab及相关变体的所有上述蛋白水解和工程化片段(对于更多详细内容,参见Hollinger和Hudson,2005;Olafsen和Wu,2010)均包含在术语Ab的“抗原结合部分”内。

[0168] 在所公开发明的某些方面中,分离的抗CD27 Ab的抗原结合部分是Ab片段或单链Ab。在某些实施方案中,Ab片段选自Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fd和Fv片段、sdAb、单链可变片段(scFv)、双价scFv(di-scFv)和二价scFv(bi-scFv)、二抗体、迷你抗体和CDR。在某些优选实施方案中,Ab片段选自Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fd和Fv片段,以及单链可变片段(scFv)。

[0169] 在某些实施方案中,分离的抗CD27 Ab或其抗原结合部分是人Ab或其片段。在其他实施方案中,是人源化Ab或其片段。在更多实施方案中,是嵌合Ab或其片段。在其他实施方案中,分离的抗CD27 Ab或其抗原结合部分是小鼠Ab或其片段。对于施用于人受试者,Ab优选是嵌合Ab,或更优选,人源化或人Ab。这样的嵌合、人源化、人或小鼠mAb可以通过本领域公知的方法来制备和分离。

[0170] 抗CD27免疫缀合物

[0171] 在另一个方面中,本发明涉及连接治疗剂(如细胞毒素或放射性同位素)的本文公开的任一种分离的抗CD27 Ab,或其抗原结合部分。这样的缀合物在本文中称为“免疫缀合物”。可以使用本领域可利用的接头技术,将细胞毒素与本发明的Ab缀合。用于制备放射性免疫缀合物的方法在本领域中也已建立。

[0172] 双特异性分子

[0173] 在另一个方面中,本发明涉及包含连接具有不同于抗CD27 mAb或其抗原结合部分的结合特异性的结合结构域的本文公开的任一种分离的抗CD27 Ab或其抗原结合部分的双特异性分子。所述结合结构域可以是功能性分子,例如,另一种Ab,或Ab的抗原结合部分,或受体的配体,使得所产生的双特异性分子结合至少两个不同的结合位点或靶分子。

[0174] 编码抗CD27 Ab的核酸和表达Ab的用途

[0175] 本公开的另一个方面涉及编码本发明的分离的抗CD27 Ab的核酸。本公开提供了分离的编码本文所述的任何CD27 Ab或其抗原结合部分的核酸。“分离的”核酸是指显著不同的核酸物质组成,即,具有与存在于自然界的核酸截然不同的化学身份、性质和效用。例如,分离的DNA,与天然DNA不同,是天然DNA的独立部分,而不是自然界中发现的较大结构复

合物染色体的组成部分。此外,与天然DNA不同,分离的DNA可以用作PCR引物或杂交探针,特别是用于测量基因表达和检测生物标志物基因或突变以诊断疾病或预测治疗剂的功效。使用本领域公知的标准技术,也可以纯化分离的核酸以使其基本上不含其他细胞组分或其他污染物,例如其他细胞核酸或蛋白质。

[0176] 可以使用标准分子生物学技术获得本发明的核酸。对于由杂交瘤表达的Ab(例如,如实施例1中所述的,从携带人Ig基因的转基因小鼠制备的杂交瘤),可以通过标准PCR扩增技术获得编码由杂交瘤产生的Ab的轻链和重链或可变区的cDNA。一旦获得了编码V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>片段的DNA片段,就可以使用标准重组DNA技术进一步操纵这些DNA片段,例如,将可变区DNA转换成全长Ab链基因、Fab片段基因或scFv基因。对于从Ig基因库获得的Ab(例如,使用噬菌体展示技术),可以从该库中回收编码Ab的核酸。

[0177] 本发明的核酸可以是例如RNA或DNA,如cDNA或基因组DNA。在优选实施方案中,核酸是cDNA。

[0178] 本公开还提供了表达载体,其包含编码抗CD27Ab或其抗原结合部分的分离核酸。本公开进一步提供了包含所述表达载体的宿主细胞。真核细胞,且最优选哺乳动物宿主细胞,优选作为用于表达Ab的宿主细胞,因为这种真核细胞,且特别是哺乳动物细胞,比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠且具有免疫活性的Ab。用于表达本发明的重组Ab的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(Kaufman和Sharp,1982)、NSO骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。

[0179] 宿主细胞可以用于制备抗CD27mAb或其抗原结合部分的方法中,所述方法包括在宿主细胞中表达mAb或其抗原结合部分并从宿主细胞分离mAb或其抗原结合部分。宿主细胞可以离体或在体内使用。可以将编码Ab重链和轻链的DNA插入分开的表达载体,或更常见地,将两者都插入同一载体中。通过将编码这些可变区的DNA插入已经编码所需同种型的重链和轻链恒定区的表达载体中,Ab的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区段可用于形成任何同种型的全长Abs,使得V<sub>H</sub>区段可操作地连接载体内的一个或多个C<sub>H</sub>区段,并且V<sub>K</sub>区段与载体内的C<sub>L</sub>区段可操作地连接。

[0180] 本发明的另一个方面涉及包括人Ig重链和轻链转基因的转基因小鼠,其中小鼠表达本文公开的任何抗CD27 HuMAb。本发明还包括从所述小鼠制得的杂交瘤,其中所述杂交瘤产生HuMAb。

[0181] 适用于所公开的治疗方法中的抗PD-1/抗PD-L1 Ab

[0182] 适用于本文公开的癌症治疗方法、组合物或药盒中的抗PD-1Ab包括分离的Ab,优选mAb或其抗原结合部分,其以高特异性和亲和力结合PD-1,阻断PD-L1和/或PD-L2与PD-1的结合,并抑制PD-1信号传导途径的免疫遏制作用。相似地,适用于这些方法中的抗PD-L1 Ab是分离的Ab,优选mAb或其抗原结合部分,其以高特异性和亲和力结合PD-L1,阻断PD-L1与PD-1和CD80(B7-1)的结合,并抑制PD-1信号传导途径的免疫遏制作用。在本文公开的任何疗法方法中,抗PD-1或抗PD-L1 Ab包括分别结合PD-1受体或PD-L1配体的抗原结合部分或片段,并且在抑制受体-配体结合和逆转T细胞活性抑制中呈现出与完整Ab的那些相似的功能特性,由此上调免疫应答。

[0183] 抗PD-1Ab

[0184] 以高亲和力特异性结合PD-1的mAb已公开于美国专利No.8,008,449中。其他抗PD-

1mAb已描述于例如美国专利No.7,488,802、8,168,757、8,354,509和9,205,148。美国专利No.8,008,449中公开的抗PD-1mAb已证明了呈现以下的几个或全部特征：(a)以约50nM或更低的 $K_D$ 结合人PD-1,如通过SPR(**BIACORE®**)生物传感器系统测定的；(b)基本上没有结合人CD28、CTLA-4或ICOS；(c)在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中提高T-细胞增殖、干扰素- $\gamma$ 产生和IL-2分泌；(d)结合人PD-1和食蟹猴PD-1；(e)抑制PD-L1和PD-L2与PD-1的结合；(f)释放Treg细胞对CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞的增殖和干扰素- $\gamma$ 产生强加的抑制；(g)刺激抗原特异性记忆应答；(h)刺激Ab应答；和(i)在体内抑制肿瘤细胞生长。在所公开的治疗方法、组合物或药盒中有用的抗PD-1Ab包括以高亲和力特异性结合人PD-1并呈现至少五个和优选全部前述特征的mAb。例如,适用于本文公开的治疗方法中的抗PD-1Ab(a)以约10nM至0.1nM的 $K_D$ 结合人PD-1,如通过SPR(**BIACORE®**)生物传感器系统测定的；(b)在MLR测定中提高T细胞增殖、干扰素- $\gamma$ 产生和IL-2分泌；(c)抑制PD-L1和PD-L2与PD-1的结合；(d)逆转Treg对CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞的增殖和干扰素- $\gamma$ 产生强加的抑制；(e)刺激抗原特异性记忆应答；和(f)在体内抑制肿瘤细胞生长。

[0185] 其他抗PD-1mAb已经描述于例如美国专利No.6,808,710、7,488,802、8,168,757、8,354,509和9,987,500,美国公开No.2016/0272708和PCT公开No.WO 2008/156712、WO 2012/145493、WO 2014/179664、WO 2014/194302、WO 2014/206107、WO 2015/035606、WO 2015/085847、WO 2015/112900、WO 2016/106159、WO 2016/197367、WO 2017/020291、WO 2017/020858、WO 2017/024465、WO 2017/024515、WO 2017/025016、WO 2017/025051、WO 2017/040790、WO 2017/106061、WO 2017/123557、WO 2017/132827、WO 2017/133540,将每篇全部按引用并入本文中。

[0186] 在某些实施方案中,抗PD-1mAb选自纳武单抗(**OPDIVO®**;之前称为5C4、BMS-936558、MDX-1106或ONO-4538)、派姆单抗(**KEYTRUDA®**;之前称为lambrolizumab和MK-3475;参见WO 2008/156712A1)、西米单抗(**LIBTAYO®**;之前称为REGN-2810;参见WO 2015/112800)、PDR001(参见WO 2015/112900)、MEDI-0680(之前称为AMP-514;参见WO 2012/145493)、JS001(参见Liu和Wu,2017)、BGB-A317(参见WO 2015/035606和US 2015/0079109)、INCSHR1210(SHR-1210;参见WO 2015/085847;Liu和Wu,2017)、TSR-042(ANB011;参见WO 2014/179664)、GLS-010(WBP3055;参见Liu和Wu,2017)、AM-0001(参见WO 2017/123557)、STI-1110(参见WO 2014/194302)、AGEN2034(参见WO 2017/040790)和MGD013(参见WO 2017/106061)。

[0187] 在本文所述的包括施用抗PD-1Ab的任何治疗方法的某些优选实施方案中,所述抗PD-1Ab是已被美国食品和药物管理局(FDA)批准的用于治疗多种不同癌症的纳武单抗(**OPDIVO®**)。纳武单抗是选择性地防止与PD-1配体(PD-L1和PD-L2)相互作用的完全人IgG4(S228P)PD-1免疫检查点抑制剂Ab,从而阻断抗肿瘤T细胞功能的下调(在美国专利NO.8,008,449中描述为mAb C5;Wang等,2014)。在其他优选实施方案中,抗PD-1Ab是派姆单抗(**KEYTRUDA®**);针对PD-1的人源化单克隆IgG4 Ab,并在美国专利No.8,354,509中描述为h409A11),其也已被批准用于多种癌症适应症。

[0188] 可用于所公开的方法、组合物或药盒中的抗PD-1Ab还包括特异性结合人PD-1

(hPD-1) 并与本文所述的任一抗PD-1Ab (例如: 纳武单抗 (5C4; 参见, 例如, 美国专利No. 8, 008, 449; WO 2013/173223) 和派姆单抗) 交叉竞争与人PD-1结合的分选抗体, 优选mAb。可以在标准PD-1结合测定 (如 **BIACORE®** 分析、ELISA测定或流式细胞术) 中容易地鉴定出与参照Ab (如纳武单抗或派姆单抗) 交叉竞争与抗原 (在这种情况下为人PD-1) 结合的Ab (参见, 例如, WO 2013/173223)。在某些实施方案中, 抗PD-1Ab结合与本文所述的任何抗PD-1抗体 (例如纳武单抗或派姆单抗) 相同的表位。

[0189] 可用于所公开的发明的方法中的抗PD-1抗体还包括抗原结合部分, 包括Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fd或Fv片段、sdAb、scFv、di-scFv或bi-scFv、二抗体、迷你抗体和分离的CDR (对于更多详细信息, 参见Hollinger和Hudson, 2005年; Olafsen和Wu, 2010年)。

[0190] 在某些实施方案中, 分离的抗PD-1Ab或其抗原结合部分包含其是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的重链恒定区的重链恒定区。在某些优选实施方案中, 抗PD-1Ab或其抗原结合部分包含其是人IgG4同种型的重链恒定区的重链恒定区。在其他实施方案中, 抗PD-1Ab或其抗原结合部分是人IgG1同种型的。在某些其他实施方案中, 抗PD-1Ab或其抗原结合部分的IgG4重链恒定区含有S228P突变 (根据EU编号系统编号的, Kabat等, 1991; 或, 可选的, S241P, 根据Kabat系统编号的, Kabat等, 1987), 其用通常在IgG1同种型Ab的相应位置上发现的脯氨酸残基代替铰链区中的丝氨酸残基。该突变存在于纳武单抗中, 防止Fab臂与内源性IgG4 Ab交换, 同时保留了激活与野生型IgG4 Ab相关的Fc受体的亲和力 (Wang等, 2014)。再在其他实施方案中, Ab包含其是人κ或λ恒定区的轻链恒定区。

[0191] 在本方法的其他实施方案中, 抗PD-1Ab或其抗原结合部分是mAb或其抗原结合部分。为了施用于人受试者, 抗PD-1Ab优选是嵌合Ab, 或更优选是人源化或人Ab。这样的嵌合、人源化或人mAb可以通过本领域众所周知的方法来制备和分离, 例如, 如美国专利No. 8, 008, 449中所述的。

[0192] 抗PD-L1 Ab

[0193] 因为抗PD-1和抗PD-L1靶向相同的信号传导途径, 并且已在临床试验中显示出在各种癌症中呈现出相当水平的功效 (参见, 例如Brahmer等, 2012; WO 2013/173223), 在本文公开的联合疗法方法中, 抗PD-L1 Ab可以代替抗PD-1Ab。

[0194] 适用于所公开的方法、组合物或药盒中的抗PD-L1 Ab是分离的Ab, 其以高特异性和亲和力结合PD-L1, 阻断PD-L1与PD-1和CD80的结合, 并抑制PD-1信号传导途径的免疫遏制作用。在美国专利No. 7, 943, 743中已经公开了以高亲和力特异性结合PD-L1的mAb。其他抗PD-L1 mAb已经描述于例如美国专利No. 8, 217, 149、8, 779, 108、9, 175, 082、9, 624, 298和9, 938, 345以及PCT公开号WO 2012/145493中。已证明美国专利No. 7, 943, 743中公开的抗PD-1HuMAb呈现出以下的一个或多个特征: (a) 以约50nM或更低的K<sub>D</sub>结合人PD-1, 如通过SPR测定的 (**BIACORE®**); (b) 在MLR测定中增加T细胞增殖、干扰素-γ产生和IL-2分泌; (c) 刺激Ab应答; (d) 抑制PD-L1与PD-1的结合; 和 (e) 逆转Treg对T细胞效应细胞和/或树突细胞的遏制作用。用于本文公开的治疗方法中的抗PD-L1 Ab包括分离的Ab, 优选mAb, 其以高亲和力特异性结合人PD-L1并表现出至少一个, 在一些实施方案中, 至少三个, 优选全部, 前述特征。例如, 适用于这些方法中的抗PD-L1 Ab (a) 以约50nM至0.1nM的K<sub>D</sub>结合人PD-1, 如通过SPR (**BIACORE®**) 测定的; (b) 在MLR试验中增加T细胞增殖、γ干扰素产生和IL-2分泌;

(c) 抑制PD-L1与PD-1和CD80的结合;和(d) 逆转Treg对T细胞效应细胞和/或树突细胞的遏制作用。

[0195] 用于本发明方法中的合适的抗PD-L1 Ab是BMS-936559(之前为MDX-1105;在美国专利No.7,943,743中指定为12A4)。其他合适的抗PD-L1抗体包括阿妥珠单抗(TECENTRIQ®;之前称为RG7446和MPDL3280A;在美国专利No.8,217,149中指定为YW243.55S70;也请参见Herbst等,2014)、德瓦鲁单抗(IMFINZI®;之前称为MEDI-4736;在美国专利No.8,779,108中指定为2.14H90PT)、阿维单抗b(BAVENCIO®;以前称为MSB-0010718C;在美国专利No.9,624,298中指定为A09-246-2),STI-A1014(在美国专利No.9,175,082中指定为H6)、CX-072(参见WO 2016/149201)、KN035(参见Zhang等,2017)、LY3300054(参见,例如,WO 2017/034916)和CK-301(参见Gorelik等,2017)。

[0196] 适用于所公开的方法、组合物或药盒中的抗PD-L1 Ab还包括特异性结合人PD-L1的以及参照Ab交叉竞争与人PD-L1的结合的分离Ab,所述参照Ab可以是本文公开的任一抗PD-L1 Ab,例如BMS-936559(12A4;参见,例如,美国专利No.7,943,743;WO 2013/173223)、阿妥珠单抗、德瓦鲁单抗、阿维单抗或STI-A1014。Ab与参照Ab交叉竞争与人PD-L1结合的能力证明了这样的Ab与参照Ab结合相同的PD-L1表位区域,并通过其结合基本上相同的PD-L1的表位区,预期与参照Ab具有极为相似的功能特性。在一些实施方案中,抗PD-L1Ab结合与本文所述的任何抗PD-L1 Ab相同的表位,例如阿妥珠单抗、德瓦鲁单抗、阿维单抗或STI-A1014。可以在本领域技术人员众所周知的标准PD-L1结合测定(如BIACORE®分析、ELISA测定或流式细胞术)中基于与参照Ab(如阿妥珠单抗或阿维单抗)交叉竞争的能力,容易地鉴定出交叉竞争的Ab(参见例如WO 2013/173223)。

[0197] 在某些优选的实施方案中,用于本发明方法中的分离抗PD-L1 Ab是mAb。在其他实施方案中,尤其是对于施用于人受试者,这些Ab优选是嵌合Ab,或更优选是人源化或人Ab。嵌合、人源化或人mAb可以通过本领域众所周知的方法来制备和分离,例如,如美国专利No.7,943,743中所述的。

[0198] 在某些实施方案中,抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分包括其是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的重链恒定区的重链恒定区。在某些其他实施方案中,抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分是人IgG1或IgG4同种型的。在更多实施方案中,抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分的IgG4重链恒定区的序列含有S228P突变。在其他实施方案中,Ab包含其是人κ或λ恒定区的轻链恒定区。

[0199] 本发明的抗PD-L1 Ab还包括以上Ab的抗原结合部分,包括Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv和scFv、di-scFv或bi-scFv、以及scFv-Fc片段、纳米抗体、二抗体、三抗体、四抗体和分离的CDR,其结合PD-L1并在受体结合和上调免疫系统中呈现出与完整Ab的那些相似的功能性质。

[0200] 治疗方法

[0201] 用抗CD27 Ab作为单一疗法的癌症治疗

[0202] 如实施例8中所述的,抗mCD27 mAb,8H5,抑制CT26结肠癌和纤维肉瘤肿瘤模型中的肿瘤生长(参见图14和表7)。因此,本公开提供了一种用于治疗罹患癌症的受试者的方法,包括将治疗有效量的本文公开的任一种抗CD27Ab、免疫缀合物或双特异性分子,或包含

任一种所述的抗CD27 Ab、免疫缀合物或双特异性分子的药物组合物施用于受试者,使得受试者得到治疗。

[0203] 本公开还提供了一种用于抑制受试者中的肿瘤细胞生长的方法,包括将治疗有效量的本文公开的任一种抗CD27 Ab、免疫缀合物或双特异性分子,或包含所述任一种所述的抗CD27 Ab、免疫缀合物或双特异性分子的药物组合物施用于受试者,使得受试者中的肿瘤细胞的生长得到抑制。

[0204] 用抗CD27 Ab结合另一种抗癌剂治疗癌症

[0205] 如实施例8中所述的,抗mCD27 mAb,8H5,加强了抗mPD-1mAb在不同癌症类型中的活性,包括CT26结肠癌、SA1N纤维肉瘤和EG7淋巴瘤小鼠模型(参见图14和表7)。因此,抗CD27Ab与检查点抑制剂例如抗PD-1Ab联合式更有效的抑制肿瘤生长。因此,本公开提供了一种用于治疗罹患癌症的受试者的方法,包括向受试者施用治疗有效量的:(a)本文公开的任一种抗CD27 Ab、免疫缀合物或双特异性分子,或包含任一种所述的抗CD27抗体、免疫缀合物或双特异性分子的药物组合物;(b)用于治疗癌症的其他治疗剂,使得受试者得到治疗。

[0206] 本公开还提供了用于一种用于抑制受试者中的肿瘤细胞生长的方法,包括向受试者施用治疗有效量的:(a)本文公开的任一种抗CD27 Ab、免疫缀合物或双特异性分子,或包含任一种所述的抗CD27抗体、免疫缀合物或双特异性分子的药物组合物;(b)用于治疗癌症的其他治疗剂,使得受试者中的肿瘤细胞的生长得到抑制。

[0207] 在本发明的任何方法的某些优选实施方案中,受试者是人患者。

[0208] 在某些实施方案中,其他治疗剂是降低免疫系统的抑制或提高免疫系统的刺激的化合物。例如,其他治疗剂可以是小分子化合物、大环肽、融合蛋白或Ab。在进一步的实施方案中,所述的其他治疗剂是特异性结合PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、TIM-3、KIR、KLRG-1、A2aR、TIGIT、VISTA受体、CD244或CD160的拮抗性Ab。在其他实施方案中,其他治疗剂是特异性结合ICOS、CD137、CD134、CD27、GITR或HVEM的激动性Ab。在某些实施方案中,其他治疗剂是特异性结合PD-1或PD-L1、破坏PD-1和PD-L1之间的相互作用和抑制PD-1/PD-L1信号传导的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中,特异性结合PD-1或PD-L1的Ab或其抗原结合部分是嵌合、人源化或人mAb或其抗原结合部分。在某些实施方案中,其他治疗剂是特异性结合PD-1并与纳武单抗交叉竞争与人PD-1结合的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中,其他治疗剂是特异性结合PD-1的拮抗性Ab或其抗原结合部分,并且是纳武单抗或派姆单抗。在某些实施方案中,其他治疗剂是特异性结合PD-L1并与指定为BMS-936559的Ab(WO 2013/173223)交叉竞争与人PD-L1结合的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中,其他治疗剂是特异性结合PD-L1的拮抗性Ab或其抗原结合部分,并且是阿妥珠单抗、德瓦鲁单抗、阿维单抗或指定为BMS-936559的Ab(WO 2013/173223)。

[0209] 通过所公开的方法可治疗的癌症

[0210] 依赖于利用免疫系统的几乎无限的灵活性来攻击和破坏癌细胞的免疫肿瘤学可用于治疗非常广泛的癌症(参见,例如,Yao等,2013;Callahan等,2016;Pianko等,2017;Farkona等,2016;Kamta等,2017)

[0211] 在某些实施方案中,所公开的疗法方法可以用于治疗其是实体瘤的癌症。

[0212] 在某些实施方案中,实体瘤是结肠癌或纤维肉瘤。在某些的实施方案中,实体瘤是

选自鳞状细胞癌,小细胞肺癌(SCLC),非小细胞肺癌(NSCLC),鳞状NSCLC,非鳞状NSCLC,头颈癌,乳腺癌,食道癌,胃癌,胃肠道癌,小肠癌,肝癌,肝细胞癌(HCC),肝细胞瘤,胆囊和胆管癌,胰腺癌(PAC),胰腺导管腺癌(PDAC),肾癌,肾细胞癌(RCC),膀胱癌,尿道癌,输尿管癌,结肠直肠癌(CRC),结肠癌,肛门区域癌,子宫内膜癌,前列腺癌,神经母细胞瘤,神经胶质瘤,胶质母细胞瘤,生殖细胞肿瘤,小儿肉瘤,鼻窦自然杀伤者,黑色素瘤,皮肤癌,Merkel细胞癌,基底细胞癌,骨癌,宫颈癌,子宫癌,子宫内膜的癌症、输卵管癌,卵巢癌,宫颈癌,阴道癌,外阴癌,睾丸癌,内分泌系统癌,胸腺肿瘤,胸腺淋巴肉瘤(thymoma),甲状腺癌,口癌(oral cancer),口腔癌(mouth cancer)、甲状旁腺癌,肾上腺癌,软组织肉瘤,阴茎癌,肾盂癌,中枢神经系统(CNS)肿瘤,原发性CNS淋巴瘤,肿瘤血管生成,脊髓轴肿瘤,脑癌,脑干神经胶质瘤,垂体腺瘤,卡波西肉瘤,表皮样癌,鳞状细胞癌,神经母细胞瘤,垂体腺瘤,表皮样癌,儿童实体瘤,小儿肉瘤,横纹肌肉瘤,原发性来源未知的癌症,环境诱发的癌症,病毒相关的癌症,AIDS相关的癌症,病毒源癌症,晚期癌症,不可切除的癌症,转移性癌症,难治性癌症,复发性癌症,以及前述实体瘤任意组合的癌症。

[0213] 在某些实施方案中,实体瘤是选自小细胞肺癌(SCLC)、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非鳞状NSCLC和三阴性乳腺癌(TNBC)的癌症。

[0214] 本发明的抗CD27 Ab在其中化疗和/或放疗是关键治疗方法并且需要促进持续的抗肿瘤免疫力的疾病早期也是有效的。在某些实施方案中,实体肿瘤是选自食道癌、胃癌、直肠癌、非小细胞肺癌(NSCLC)和头颈鳞状细胞癌(SCCHN)的癌症。

[0215] 在某些其他实施方案中,实体肿瘤选自黑色素瘤、肾癌、NSCLC、结肠癌、胃癌、膀胱癌和神经母细胞瘤。

[0216] 在某些实施方案中,公开的疗法方法可用于治疗其是血液学恶性疾病的或肿瘤细胞是血液学恶性疾病的细胞的癌症。血液学恶性疾病包括源自两种主要血细胞谱系的液体肿瘤,即髓样细胞系(其产生粒细胞、红细胞、凝血细胞、巨噬细胞和肥大细胞)或淋巴样细胞系(其产生B、T、NK和浆细胞),包括所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。可以使用本发明的疗法方法治疗的血液学恶性疾病包括例如选自急性淋巴母细胞白血病(ALL),急性粒细胞性白血病(AML),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),慢性髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤(HL),非霍奇金淋巴瘤(NHL),多发性骨髓瘤,阴燃骨髓瘤,意义未定的单克隆丙种球蛋白病(MGUS),晚期、转移性、难治性和/或复发性血液学恶性疾病,以及所述血液学恶性疾病的任何组合的癌症。

[0217] 在其他实施方案中,血液学恶性疾病是选自以下的癌症:急性、慢性、淋巴细胞性(淋巴母细胞性)和/或骨髓性白血病,如ALL、AML、CLL和CML;淋巴瘤,如HL、NHL,其中约85%是B细胞淋巴瘤,包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL),套细胞淋巴瘤,边缘区B细胞淋巴瘤(黏膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤,结节边缘区B细胞淋巴瘤和脾边缘区B细胞淋巴瘤),伯基特淋巴瘤,淋巴浆细胞样淋巴瘤(LPL;也称为Waldenström巨球蛋白血症(WM),毛细胞淋巴瘤和原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤,是T细胞淋巴瘤的NHL,包括前体T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病,T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病(T-Lb1y/T-ALL),外周T细胞淋巴瘤,如皮肤T细胞淋巴瘤(CTLC,即蕈样真菌病,Sezary综合征等),成人T细胞淋巴瘤/白血病,血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤,结节外天然杀伤/T细胞淋巴瘤鼻型,与肠病相关的肠T细胞淋巴瘤(EATL),间变性

大细胞淋巴瘤 (ALCL) 和未明确的外周T细胞淋巴瘤, 急性髓细胞样淋巴瘤, 淋巴浆细胞样淋巴瘤, 单核细胞样B细胞淋巴瘤, 血管中心性淋巴瘤, 肠T细胞淋巴瘤, 原发性纵隔B细胞淋巴瘤, 移植后淋巴增生性疾病, 真性组织细胞淋巴瘤, 原发性渗出性淋巴瘤, 弥漫性组织细胞淋巴瘤 (DHL), 免疫母细胞性大细胞淋巴瘤和前体B淋巴母细胞淋巴瘤; 骨髓瘤, 如多发性骨髓瘤, 阴燃骨髓瘤 (也称为无痛性骨髓瘤), 意义未定的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS), 孤立性浆细胞瘤, IgG骨髓瘤, 轻链骨髓瘤, 非分泌性骨髓瘤和淀粉样变性; 以及所述血液学恶性疾病的任何组合。本方法还适用于治疗晚期、转移性、难治性和/或复发性血液学恶性疾病。

[0218] 关于联合疗法, 抗PD-1Ab纳武单抗已显示出可有效治疗多种不同类型的癌症 (参见, 例如Brahmer等, 2015; Guo等, 2017; Pianko等, 2017; W02013/173223), 并且目前正在多种实体和血液系统癌症中进行临床试验。纳武单抗已被批准用于治疗晚期黑色素瘤、晚期非小细胞肺癌、转移性肾细胞癌、经典霍奇金淋巴瘤、晚期头颈鳞状细胞癌、膀胱上皮癌、MSI-H或dMMR转移性结直肠癌和肝细胞癌和小细胞肺癌 (Drugs.com-Opdivo Approval History: <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>), 并且正在进行许多其他癌症的临床试验。同样, 其他抗PD-1药物, 如派姆单抗 (KEYTRUDA®) 和西米单抗 (LIBTAYO®), 以及抗PD-L1药物, 如阿妥珠单抗 (TECENTRIQ®)、德瓦鲁单抗 (IMFINZI®) 和阿维单抗 (BAVENCIO®) 已在各种适应症中获得批准。因此, 使用本文公开的抗CD27 Ab和抗PD-1/PD-L1抗体的组合可以治疗多种不同的癌症。这种疗法的组合表现出的高功效使得可以专注于因未满足的医疗需求困扰的癌症。

[0219] 抗CD27和抗PD-1/抗PD-L1 Ab的医学用途

[0220] 如上所述, 本公开提供了分离的抗CD27 Ab, 优选mAb或其抗原结合部分, 用于治疗罹患癌症的受试者的方法中。本公开进一步提供了分离的抗CD27抗体, 优选mAb或其抗原结合部分, 和检查点抑制剂, 如分离的抗PD-1/抗PD-L1Ab, 优选mAb或其抗原结合部分, 联合用于治疗罹患癌症的受试者的方法中。抗CD27 Ab可以用作单一疗法或联合检查点抑制剂 (如抗PD-1/抗PD-L1抗体), 用于治疗本文公开的所有范围的癌症。

[0221] 所公开的发明的一个方面需要本发明的分离的抗CD27 Ab或其抗原结合部分在制备用于治疗罹患癌症的受试者的药物中的用途。抗CD27 Ab可单独使用或联合检查点抑制剂 (如分离的抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分), 用于制备治疗癌症患者的药物。任何这样的抗CD27 Ab和抗PD-1/抗PD-L1 Ab在制备药物中的用途广泛适用于本文公开的所有癌症。

[0222] 本公开还提供了抗CD27 Ab或其抗原结合部分联合检查点抑制剂 (如分离的抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分), 用于治疗癌症的方法中, 所述方法对应于使用本文描述的这种治疗剂组合的治疗方法的所有实施方案。

[0223] 药物组合物和剂量方案

[0224] 本文公开的任何疗法方法中使用的Ab可以构成组合物, 例如, 药物组合物, 其含有Ab和药学上可接受的载体。如本文使用的, “药学上可接受的载体” 包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选, 用于含有Ab的组合物的载体适用于静脉内 (IV)、肌内、皮下 (SC)、胃肠外、脊髓或表皮施用 (例如, 通过注射或输注)。

[0225] SC注射的选择基于Halozyme Therapeutics的ENHANZE®药物递送技术,其涉及将Ab与重组人透明质酸酶(rHuPH20)共同配制,从而消除了由于胞外基质传统上对可皮下递送的生物制剂和药物体积的限制(美国专利No.7,767,429)。还可以将联合疗法中使用的两种Ab共同配制成用于SC施用的单一组合物。

[0226] 本发明的药物组合物可以包括一种或多种药学上可接受的盐、抗氧化剂、水性和非水性载体和/或佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

[0227] 剂量方案可以调节,以提供最佳的所需应答,例如,最大的治疗应答和/或最小的不良影响。对于抗CD27、抗PD-1或抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分的施用,包括联合使用,剂量范围可以为约0.01至约20mg/kg受试者体重,优选约0.1至约10mg/kg受试者体重。例如,剂量可以为约0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1,2,3,5或10mg/kg体重。或者,可以施用固定剂量或平剂量,例如,约50至约2000mg Ab或其抗原结合部分,替代基于体重的剂量。例如,可以施用约50、100、200、400、500、800、1000、1200、1500、1600或2000mg的抗体的固定剂量。给药时间表通常设计成基于Ab的典型药代动力学特性获得导致持续的受体占用(R0)的暴露。示例性治疗方案需要约每周一次,约每2周一次,约每3周一次,约每4周一次,约每月一次,约每3-6月或更长时间一次。在某些实施方案中,约每2周一次,将抗CD27、抗PD-1或抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分施用于受试者。在其他优选实施方案中,约每3周一次施用Ab或其抗原结合部分。在其他优选实施方案中,约每4周一次施用Ab或其抗原结合部分。剂量和时间表在治疗过程期间可以改变。在某些优选实施方案中,约每2周一次,将约240mg的固定剂量或平剂量的抗PD-1Ab或其抗原结合部分施用于受试者。在其他优选实施方案中,约每4周一次,将约480mg的固定剂量或平剂量的抗PD-1Ab或其抗原结合部分施用于受试者。在某些实施方案中,抗PD-1Ab是纳武单抗。

[0228] 联合使用时,可以使用一种或两种Ab的亚治疗剂量,例如抗CD27、抗PD-1和/或抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分的剂量低于典型或批准的单一疗法剂量。例如,将低于批准剂量之一每2周3mg/kg的纳武单抗的剂量,例如,每2、3或4周1.0mg/kg或更少,视为亚治疗剂量。15名给药0.3mg/kg至10mg/kg纳武单抗的受试者的R0数据表明了在这个剂量范围内,PD-1的占用似乎非剂量依赖的。在所有剂量下,平均占用率为85%(范围为70%至97%),平均平台占用率为72%(范围为59%至81%)(Brahmer等,2010)。因此,0.3mg/kg的剂量可以允许足够的暴露以导致显著的生物活性。

[0229] 在小鼠肿瘤模型中观察到的协同相互作用(实施例8)可以允许以亚治疗剂量给癌症患者施用任何抗CD27和抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分。在所公开的联合疗法方法的某些实施方案中,将抗CD27 Ab或其抗原结合部分以亚治疗剂量施用于癌症患者。在其他实施方案中,将抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分以亚治疗剂量施用于患者。在进一步的实施方案中,抗PD-1/抗PD-L1和抗CD27 Ab或其抗原结合部分各自以亚治疗剂量施用于患者。

[0230] 与在单一疗法中使用更高剂量的单个Ab相比,这种亚治疗剂量的一种或两种Ab的施用可以减少不良事件。因此,所公开的联合疗法方法的成功不仅可以通过Ab组合相对于使用这些Ab的单一疗法的疗效提高来衡量,而且可以通过使用相对于单一疗法剂量的联合药物的较低剂量而提高的安全性(即,降低的不良事件的发生率)来衡量。

[0231] 在本文公开的任何方法的某些实施方案中,抗CD27、抗PD-1和/或抗PD-L1Ab配制

用于静脉内 (IV) 施用或皮下 (SC) 注射。在某些实施方案中,将抗CD27 Ab或其抗原结合部分和抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分按序施用于受试者。“按序”施用表示抗CD27和抗PD-1/抗PD-L1中的一种在另一种之前施用。任一种Ab可以先施用;即,在某些实施方案中,抗PD-1/抗PD-L1 Ab可以在抗CD27 Ab前施用,而在其他实施方案中,抗CD27 Ab在抗PD-1/抗PD-L1 Ab之前施用。在某些实施方案中,每种Ab通过IV输注施用,例如,通过在约30分钟或约60分钟的时间段中输注。在其他实施方案中,至少一种Ab通过SC注射来施用。

[0232] 在按序IV施用的某些实施方案中,为了患者的方便,抗CD27和抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其部分彼此在30分钟内施用。通常,抗CD27和抗PD-1/抗PD-L1Ab两者在同一天通过IV施用递送时,对于每次输注,使用分开的输注袋和过滤器。在开始输注第二种Ab前,第一种Ab输注后及时用盐水冲洗以清洗Ab线。在其他实施方案中,两种Ab彼此在1、2、4、8、24或48h内施用。

[0233] 至少一种Ab通过SC施用的递送缩短了施用所需的健康护理操作者的时间并缩短了药物施用的时间。例如,使用SC注射可以缩短IV施用所需的时间,通常为约30-60min,缩短为约5min。在按序SC施用的某些实施方案中,抗CD27和抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其部分彼此在10min内施用。

[0234] 因为检查点抑制剂Ab已经显示出产生非常持久的应答,这部分是由于免疫系统的记忆成分引起的(参见,例如,W02013/173223;Lipson等,2013;Wolchok等,2013),施用的抗PD-1/抗PD-L1 Ab的活性可以持续数周、数月或甚至数年。在某些实施方案中,本发明涉及按序施用的联合疗法方法需要将抗CD27 Ab施用于之前已经用抗PD-1/抗PD-L1 Ab治疗的患者。在更多实施方案中,将抗CD27Ab施用于之前已经用抗PD-1/抗PD-L1 Ab治疗的并且进展的患者。在其他实施方案中,本发明涉及按序施用的联合疗法方法需要将抗PD-1/抗PD-L1 Ab施用于之前已经用抗CD27 Ab治疗的患者,任选其癌症在用抗CD27 Ab治疗后已经进展的患者。

[0235] 在某些其他实施方案中,抗PD-1/抗PD-L1和抗CD27 Ab同时施用,在药学上可接受的制剂中混合成用于同时施用的单一组合物,或作为分开的组合物同时施用,每种Ab配制于药学上可接受的组合物中。

#### [0236] 药盒

[0237] 本发明的范围内还包括包含用于治疗用途的抗CD27 Ab的药盒。药盒通常包括表明药盒内容物的预期用途和使用说明的标签。术语标签包括药盒上提供的或随药盒提供的或另外随药盒附带的任何文字或记录材料。因此,本公开提供用于治疗罹患癌症的受试者的药盒,所述药盒包括:(a) 一个或多个剂量范围为约0.1至约20mg/kg体重的本文公开的任一种抗CD27 Ab或其抗原结合部分、免疫缀合物或双特异性分子,或包含任一种所述抗CD27 Ab或其抗原结合部分、免疫缀合物或双特异性分子的药物组合物;和(b) 在本文公开的任何方法中使用mAb或其部分的说明。本公开进一步提供一种用于治疗罹患癌症的受试者的药盒,所述药盒包括:(a) 一个或多个剂量范围为约0.1至约20mg/kg体重的本文公开的任一种抗CD27 Ab或其抗原结合部分、免疫缀合物或双特异性分子,或包含任一种所述抗CD27 Ab或其抗原结合部分、免疫缀合物或双特异性分子的药物组合物;(b) 一个或多个剂量范围为约50至约2000mg的任何特异性结合PD-1或PD-L1的Ab或其抗原结合部分;和(c) 在本文公开的任何联合治疗方法中使用抗CD27 mAb和检查点抑制剂(例如,抗PD-1/抗PD-L1)的说明。

[0238] 在某些实施方案中,Ab可以以单位剂型共同包装。在用于治疗人类患者的某些优选实施方案中,药盒包括本文公开的抗人PD-1Ab,例如,纳武单抗或派姆单抗。

[0239] 通过以下实施例来进一步说明本发明,其不应当解释为进一步的限制。将整个申请中引用的所有参考文献的内容明确按引用并入本文中。

[0240] 实施例1

[0241] 对抗CD27的mAb的产生

[0242] 通过用人CD27 (hCD27) 抗原免疫表达人Ab基因的转基因小鼠,以在小鼠中引起CD27特异性的人Ig库,从而产生人抗CD27 mAb。通过用小鼠CD27 (mCD27) 抗原免疫大鼠来产生大鼠抗小鼠CD27 mAb。

[0243] 人免疫球蛋白转基因小鼠的免疫

[0244] 通过用含有hFc和组氨酸标签蛋白的重组hCD27 (rhCD27-hFc-his) 以及用hCD27稳定转染的CHO细胞交替地免疫人Ig转基因小鼠 (KM小鼠, 株系no. 325432) 来产生hCD27的HuMAb。

[0245] 产生CD27的MAb的杂交瘤的生成

[0246] 从免疫后显示出阳性抗CD27 IgG滴定的上述免疫小鼠分离小鼠脾细胞。通过将脾细胞与小鼠骨髓瘤SP2/0融合伴侣融合来生成杂交瘤。

[0247] 大鼠的免疫

[0248] 通过用含有Fc标签蛋白的小鼠CD27 (rmCD27-Fc) 免疫大鼠来生成mCD27的替代mAb。

[0249] 实施例2

[0250] 人抗人CD27 MAbs的筛选和选择

[0251] 筛选选择性结合人CD27的MAb

[0252] 为了产生结合hCD27的HuMAb,按照实施例1中所述的,用hCD27抗原免疫人Ig转基因小鼠。

[0253] 首先通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 筛选结合hCD27的杂交瘤上清液。随后通过结合hCD27<sup>+</sup>T细胞证实了抗原特异性。接着通过流式细胞术和表面等离子体共振 (SPR) 测试了Ab阻断CD27与CD70的相互作用的能力。

[0254] 激动性抗CD27 mAb的功能性筛选

[0255] 使用CHO-svCD3-CD32a测定,在体外测定了抗CD27 Ab的激动剂活性。在这个测定中,通过结合CD32a使抗CD27激动性Ab交联,导致增强的人CD4<sup>+</sup>T细胞的svCD3介导的激活。

[0256] 针对其优越的对hCD27和cCD27的结合亲和力及其优越的激活的T细胞的激动作用,选择了主导mAb,非配体阻断剂克隆16D9。使用与人CD3<sup>+</sup>T细胞共同培养的IL-2激活的人NK细胞,测定了主导mAb具有相对中等的ADCC活性水平。

[0257] 抗hCD27 HuMAb的优化

[0258] 克隆16D9随后经历了VH-A28T和VK-I20T-I22T-D43A框架逆转加轻链CDR中的S93N突变。将修饰过的克隆工程化成人IgG1并指定为BMS-986215。将BMS-986215工程化成hIgG1,以允许CD27激动作用所需的Fc交联。

[0259] 完整的hCD27氨基酸序列显示于表1中并可以在GENBANK®登录No. AAH12160下找到。表1中下划线的氨基酸1-20表示预测的信号肽。参见,例如,CBS Prediction

SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk>)。

[0260] 表1.人CD27多肽的氨基酸序列

氨基酸序列和 SEQ ID NO.	
[0261]	1 <u>marphpwwlc vlgtlvgl</u> sa tpapkscper hywaqgklcc qmcepqgflv kdcdqhrkaa 61 qcdpcipgvs fspdhhtrph cesrhensg llvrnctita naecacrngw qcrdkectec 121 dplpnpslta rssqalsphp qpthlpyvse mleartagham qtladfrqlp artlsthwpp 181 qrslesdfi rilvifsgmf lvftlagalf lhqrrkyrsn kgespvpeae pcryscpree 241 egstipiqed yrkpepacsp (SEQ ID NO:1)

[0262] 使用Kabat方法定义的HuMAb BMS-986215的6个CDR结构域的氨基酸序列显示于表2中。

[0263] HuMAb BMS-986215的V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、C<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>、重链和轻链的氨基酸序列显示于表3中。

[0264] 表2.使用Kabat方法定义的HuMAb BMS-986215中的6个CDR结构域的氨基酸序列

氨基酸序列和 SEQ ID NOs.					
VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
[0265] TTYAMN (SEQ ID NO:2)	WINTNTGNPTYAQQFTG (SEQ ID NO:3)	DFGGFDY (SEQ ID NO:4)	RASQGISSALA (SEQ ID NO:5)	DASSLES (SEQ ID NO:6)	QQFNYPRT (SEQ ID NO:7)

[0266] 表3.HuMAb BMS-986215的V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、C<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>、重链和轻链的氨基酸序列

氨基酸序列和 SEQ ID NOs.	
[0267] V <sub>H</sub>	QVQLVQSGSEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQQFTGRFVFLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:8)
V <sub>L</sub>	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLINDASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNYPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:9)
C <sub>H</sub>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN

	氨基酸序列和 SEQ ID NOs.
	HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:10)
$C_L$	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:11)
[0268] 重链	QVQLVQSGSEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDGGFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:12)
轻链	AIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLINDASSLESVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQFNYPRTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

[0269] 通过CHO细胞中的重组方法产生了Ab并通过蛋白A亲和力和色谱纯化。通过SDS-PAGE、N-末端测序和质谱分析证实了Ab的身份。Ab的纯度>98%，如通过尺寸排阻色谱(SEC)测试的。对BMS-986215的CDR区进行的特定聚集倾向(SAP)建模研究显示出低的SAP评分，表明了非常低的聚集倾向。在重链的N297(表3中的下划线)证实了单个N-糖基化位点，具有包含G0F、G1F和G2F结构的聚糖谱，如针对CHO细胞中表达的人IgG1分子所预测的。BMS-986215显示出高的热和化学稳定性。这个分子在78℃下的热可逆性为41%，其高于通常对于典型人IgG1分子看到的。BMS-986215的生物物理特征概况于表4中。

[0270] 实施例3

[0271] BMS-986215的结合动力学、结合亲和力、交叉反应性、组织特异性和稳定性的表征

[0272] BMS-986215特异性地结合人和食蟹猴CD27

[0273] 表面等离子体共振(SPR)分析证实了BMS-986215与hCD27的特异性结合。通过SPR测定了Ab与hCD27的表观亲和力( $K_D$ ) (使用BMS-986215的Fab片段和hCD27-小鼠Fc或hCD27-His标签蛋白测量的)为约40nM。在37℃下测量的值为41-44nM，而在25℃下为13-16nM。亲和力从25℃到37℃损失了3倍是由于提高的解离速率引起的，同时结合速率保持未变。动力学分析使用了1:1拟合结合模型。通过Scatchard分析测定了 $K_D$ 为0.045nM。

[0274] 通过流式细胞术测定了BMS-986215与人T细胞结合的 $EC_{50}$ 值为0.044nM(范围为

0.022至0.076nM,0.044<sup>+</sup>/<sub>-0.011nM,n=5</sub>)。通过流式细胞术测定了BMS-986215与食蟹猴T细胞结合的EC<sub>50</sub>值为0.131nM(范围为0.03569至0.2657nM,0.131<sup>+</sup>/<sub>-0.069nM,n=3</sub>),表明了BMS-986215与cCD27交叉反应。

[0275] 表4.BMS-986215的生物物理特征

性质	方法	结果
身份	N-末端测序	LC: 通过肽作图证实 HC: 通过肽作图证实
	LC-MS	143,653 Da (证实的去糖基化的完整质量) 去糖基化的, 还原的和烷基化的 HC = 49,291 Da 无糖基化的, 还原的和烷基化的 LC = 23,480 Da 对于通过质谱的肽图, > 99 %覆盖  证实的重链和轻链序列。证实的

[0276]

	LC-MS/MS肽图	重链N297的糖基化。证实的重链N-末端谷氨酰胺至焦谷氨酸盐。
[0277]	纯度/同质性	96.4%单体, 杂质包括2.2 % HHL, 0.2 % HL, 0.2 % HH, 1.0 % LC; 没有检测到未糖基化的重链
	SEC	98.6%单体, 1.4 %聚集物
	SE-MALS	98.4 % (145.3 kDa), 1.34 % (395.8 kDa), 0.22 % (56.3 kDa)
	HIC-HPLC	7.3%尾肩
	CE (聚糖)	GO=0.16%, G0F=72.57%, G1F=21.76 %, G2F=1.43%, Man5 = 4.08%。重链N297处的聚糖连接。
	cIEF	4个同种型 (主要8.83; 次要8.64, 8.7, 8.92)
化学修饰	LC-MS/MS肽图	没有观察到主要的出乎预料的化学修饰。
热稳定性和可逆性	DSC (稀释至储存缓冲液)	Tm1=71°C, Tm2=79°C, Tm3=80°C 78oC的可逆性= 41.5 %
物理稳定性	变性Gdn-HCl, 固有荧光	展开中点C <sub>50</sub> =3.24 M,

[0278] 流式细胞术分析还显示了与1F5 (人抗hCD27参照mAb) 相比, BMS-986215对h CD27和cCD27具有更高的亲和力。分别参见图1A和1B。HuMAb 1F5的重链和轻链的氨基酸序列显示于表5中。图1A中BMS-986215和1F5与人T细胞结合的EC<sub>50</sub>值分别为0.02210nM和1.088nM。图1B中BMS-986215和1F5与食蟹猴T细胞结合确定的EC<sub>50</sub>值分别为0.092nM和1.800nM。

[0279] 表5. 参照HuMAb 1F5中的重链和轻链的氨基酸序列

氨基酸序列和 SEQ ID NOs.	
[0280] 重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAP GKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSS (SEQ ID NO:20)
轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISRWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYNTYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO:21)

[0281] BMS-986215是非配体阻断MAb

[0282] 通过SPR或流式细胞术未检测到BMS-986215对CD70与CD27结合的抑制作用或反转,这与该mAb是配体非阻断性Ab相一致。参见图2B和2D。例如,使用经10 $\mu$ g/ml可溶性人CD70 (CD27的配体) 预处理,接着用BMS-986215、1F5和人IgG1 (对照) Ab处理的人T细胞进行流式细胞术分析。使用标记的抗人IgG Ab来检测Abs结合的存在与否。检测到BMS-986215的结合,表明了CD70与CD27的结合没有阻断BMS-986215的结合。参见图2A,显示了测定示意图,和图2B,显示了结果图。未检测到配体阻断1F5 Ab的结合。Id.进行了另一项流式细胞术分析,其中在存在10 $\mu$ g/ml可溶性人CD70的情况下,将人T细胞暴露于BMS-986215、1F5和人IgG1 (对照) Ab。通过标记的抗CD70Ab检测CD70。在递增浓度的BMS-986215存在下,CD70仍可检测到,表明CD70结合并未被BMS-986215阻断。参见图2C,显示了测定原理图,和图2D,显示了结果图。CD70的结合会随着配体阻断性Ab 1F5的浓度递增而降低。Id.

[0283] 组织特异性

[0284] 在初步的组织交叉反应性评估中,将异硫氰酸荧光素 (FITC) 缀合的BMS-986215 (研究级) 应用于来自22个正常人体组织 (每个1个或2个供体) 的冷冻切片。如所预期的,在胸腺、扁桃体和脾脏中的单核细胞 (MNC) 子集中,在富含淋巴的组织 (结肠、小肠和胃) 观察到了特异性染色,而在其他组织 (甲状腺、肺、皮肤、子宫、前列腺、肝脏、肾脏、胰腺、肾上腺、垂体、胎盘和睾丸) 中很少观察到特异性染色 (数据未显示)。通常,阳性细胞与背景炎症病变相关。阳性染色细胞数量最多的是扁桃体、胸腺和小肠。染色阳性的淋巴细胞集中在胸腺的髓质中,在扁桃体 (滤泡间区域) 和脾脏 (滤泡样/边缘区和PALS) 中富含T细胞中。在小肠中,阳性细胞主要分布在基础固有层和局灶性淋巴样聚集物/滤泡中。脑、小脑、心脏和外周神经均为阴性。

[0285] 实施例4

[0286] BMS-986215的表位作图

[0287] 氢/氘交换质谱 (HDX-MS) 和蛋白质快速光化学氧化 (FPOP) 方法用于探测BMS-986215结合的CD27区域。在CD27/BMS-986215上进行的HDX-MS实验提供了62%的序列覆盖,包括CD27的N-和C-末端区域。FPOP测量在CD27上产生了81%的序列覆盖率,包括CD27的中部区域。使用合并的HDX-MS和FPOP数据集,CD27的总序列覆盖率为98%。参见图3 (A)。图3 (A) 中所示的序列是没有SEQ ID NO:1的氨基酸1-20的信号肽序列的成熟CD27蛋白的序列。图3 (A) 中的氨基酸1-172对应于SEQ ID NO:1的氨基酸21-192。

[0288] HDX-MS

[0289] 在表位作图实验前,进行了非氘化实验,以生成重组全长hCD27-His标签(10 $\mu$ M)和CD27与BMS-986215(1:1摩尔比)的蛋白复合物的常用肽列表。在HDX-MS实验中,将5 $\mu$ L每种样品(CD27或CD27与BMS-986215)稀释至20 $\mu$ L D<sub>2</sub>O缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液,D<sub>2</sub>O,pD 7.0)中以开始标记反应。反应进行不同的时间段:20秒,1分钟,10分钟和240分钟。在每个标记反应阶段结束时,通过添加淬灭缓冲液(含有4M GdnCl和0.4M TCEP的100mM磷酸盐缓冲液,pH 2.5,1:1,v/v)淬灭反应。加入1 $\mu$ L胃蛋白酶/蛋白酶XIII(1:1,1mg/mL的v/v),并将蛋白质在冰上消化3分钟。将消化后的溶液注入Waters HDX-MS系统(Waters Corporation,Milford,MA)中进行分析。在不存在或存在BMS-986215的情况下,监测常见消化肽的氘吸收水平。

[0290] CD27中BMS-986215的HDX-MS数据分析表明BMS-986215结合在CD27的N-末端包含以下区域的表位结合:TPAPKSCPERHYWAQGKLCQ(SEQ ID NO:15,对应于成熟蛋白的氨基酸1至21或SEQ ID NO:1的氨基酸21至41)。

[0291] FPOP

[0292] 对CD27和BMS-986215复合物的CD27/Fab(1:1摩尔比,7.5 $\mu$ M终浓度)进行了FPOP实验。使用KrF准分子激光器通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的光解产生羟基自由基,且激发波长设置为248nm。就在标记前,将5 $\mu$ L组氨酸和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>各自加入蛋白质等分试样中。蛋白质溶液的终体积为50 $\mu$ L,且组氨酸和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的终浓度分别为500 $\mu$ M和15mM。激光能量调整为28mJ/脉冲(7.4Hz)。重复进行FPOP和无激光对照实验。将每个重复样品收集在含有11 $\mu$ L淬灭溶液(800nM过氧化氢酶四聚物和200mM甲硫氨酸)的微量离心管中。将样品变性、还原、烷基化并用胰蛋白酶消化。数据采集是在带有Waters Acquity UPLC系统(Waters Corporation)的Thermo Q Exactive Plus质谱仪(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)上进行的。使用Byonic™搜索引擎(Protein Metrics,San Carlos,CA)来提供测序覆盖和鉴定氧化位点。对于每个重复,手动计算胰蛋白酶肽的相对氧化水平。仅考虑在游离态和结合态之间相对氧化具有统计学显著差异的肽(基于Student T检验,p值<0.05),以进一步分析。

[0293] 在FPOP实验中,四个CD27肽在氧化水平上表现出显著差异:HYWAQGK(SEQ ID NO:16,对应于成熟蛋白的氨基酸11至17或SEQ ID NO:1的氨基酸31至37),LCCQMCEPGTFLVK(SEQ ID NO:17,对应于成熟蛋白的氨基酸18至31或SEQ ID NO:1的氨基酸38至51),DCDQHR(SEQ ID NO:18,对应于成熟蛋白的氨基酸32至37或SEQ ID NO:1的氨基酸52至57)和NGWQCR(SEQ ID NO:19,对应于成熟蛋白的氨基酸88至93或SEQ ID NO:1的氨基酸108至113)。结合Fab时的FPOP保护百分比计算为(CD27中FPOP差异的相对% - Fab中FPOP差异的相对百分比) / (CD27中FPOP差异的相对%) x 100。图3 (C) 显示了这四个肽的FPOP保护百分比。DCDQHR肽显示出具有最高的FPOP保护百分比(75%),表明了与BMS-986215Fab相互作用时

CD27上具有结合表位。

[0294] 基于以上HDX-MS和FPOP实验,认为BMS-986215结合的CD27表位包含两个不连续的结合区,分别为TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQ (SEQ ID NO:15)和DCDQHR (SEQ ID NO:18),对于SEQ ID NO:1的21至41和52至57的酸。

[0295] 实施例5

[0296] 通过BMS-986215的CD27拮抗作用提高了T细胞的激活

[0297] 抗CD27 mAb激动剂需Fc $\gamma$ R相互作用(即,交联)用于活性。在没有Fc $\gamma$ R<sup>+</sup>细胞的情况下,在配体阻断mAb(如1F5)存在下,没有T细胞的CD27共刺激。参见图4(A)。然而,BMS-986215mAb是非配体阻断mAb,并且进行了生物测定来确定其活性。与配体阻断mAb(如1F5)相反,数据表明了BMS-986215能够在没有Fc $\gamma$ R招募的情况下在CD70的存在下共同刺激T细胞。参见图4(B)。

[0298] BMS-986215增强NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导

[0299] 进行了原代T细胞信号转导试验,以观察BMS-986215对抗CD3加抗CD28Ab刺激的幼稚和预先激活的人T细胞中的NF- $\kappa$ B和MAPK信号转导的影响。简而言之,将人CD4<sup>+</sup>T细胞用抗CD3和抗CD28 Ab刺激24小时。将细胞以10,000个细胞/孔接种于384-孔平板中,并在添加Ab前饥饿2小时。然后在剂量/时间过程中用BMS-986215、1F5或hIgG1(对照)Ab联合交联剂处理细胞,并分析NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导。

[0300] 观察到BMS-986215以0.02nM至0.23nM的EC<sub>50</sub>诱导NF- $\kappa$ B和MAPK信号传导。例如,图5(A)-(C),显示了用Ab处理获得的NF- $\kappa$ B信号强度,且与1F5相比,BMS-986215对NF- $\kappa$ B的诱导更高。

[0301] BMS-986215增强了T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌

[0302] 使用CD4<sup>+</sup>T细胞和CHO-svCD3-CD32a细胞的共同培养物来测定BMS-986215对T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌的作用。简而言之,将来自健康供体血样的人CD4<sup>+</sup>T细胞与CHO-svCD3-CD32a细胞(表达源自抗CD3 OKT3 mAb和hCD32a-131His (Fc $\gamma$ RIIa)的单链抗CD3 scFv Ab的CHO细胞)共培养。用BMS-986215、1F5或hIgG1(对照)Ab处理了共同培养物,并分析T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌。

[0303] 观察到BMS-986215共同刺激了T细胞,导致增强的增殖和IFN- $\gamma$ 分泌,具有0.001nM至0.028nM的EC<sub>50</sub>。BMS-986215的平均EC<sub>50</sub>值对于增殖和IFN- $\gamma$ 分泌分别为0.009nM和0.0078nM。例如,图6(A)-(B)显示了与1F5相比,BMS-986215通常诱导更高的增殖和IFN- $\gamma$ 分泌。图6(A)中与T细胞增殖相关的EC<sub>50</sub>值对于BMS-986215和1F5分别为0.004503nM和0.03566nM。图6(B)中与IFN- $\gamma$ 分泌相关的EC<sub>50</sub>值对于BMS-986215和1F5分别为0.006235nM和0.04017nM。

[0304] 还使用CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞或CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>幼稚T细胞与CHO-svCD3-CD32a细胞的共同培养物进行了试验。用BMS-986215、1F5或hIgG1(对照)Ab处理了共同培养物,并分析了T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌。结果显示于图7中,BMS-986215导致了比1F5高得多水平的T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌。例如,BMS-986215分别以0.005nM和0.015nM的EC<sub>50</sub>值诱导了CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>记忆性T细胞的增殖和IFN- $\gamma$ 产生,与1F5分别的0.073nM和0.089nM的EC<sub>50</sub>值相比。

[0305] 还进行了其他测定,其中将来自两个供体的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞分开用B细胞共同培养,用葡萄球菌肠毒素B(SEB)刺激,并用BMS-986215或抗钥孔血蓝蛋白Ab、g1F糖型(KLH-

g1f) 处理,每种Ab以10 $\mu$ g/ml来使用。结果显示于图8中,BMS-986215获得了高于使用100ng/ml SEB 2.5倍的平均IFN- $\gamma$  分泌诱导。

[0306] BMS-986215增强了IL-2分泌

[0307] 在可溶性BMS-986215存在下,用或未用交联剂,测定了用SEB刺激的T细胞的白介素-2(IL-2)的产生。简而言之,将从3个供体(供体A-C)的棕黄层分离的新鲜PBMC以100,000个细胞/组织培养平板的孔接种。以80ng/mL添加SEB。用可溶性抗人IgG1(hIgG1)、抗人OX40(OX40.21)、参照抗hCD27(1F5-IgG1)或BMS-986215Ab处理细胞。在2.5 $\mu$ g/mL的作为交联剂的抗人Fc $\gamma$  Ab(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)存在下或不存在下,3倍滴定Ab。将没用SEB或Ab处理的PBMC(仅有细胞),和用SEB但未用Ab处理的PBMC(仅有SEB),用作对照。

[0308] 结果显示于图9中。没用(图9(A)和(C))或用(图9(B)和(D))可溶性Ab交联处理了来自供体A和B的PBMC。来自供体C的PBMC(图9(E))仅用可溶性Ab的交联进行了处理。结果表明了在可溶性交联的BMS-986215的存在下,与hIgG1相比,SEB刺激的人PBMC的IL-2分泌提高了高于约50%。

[0309] 进行了再一个试验,以确定联合PD-1阻断时,BMS-986215对IL-2产生的作用。简而言之,将从2个供体(供体A和B)的棕黄层分离的新鲜PBMC以100,000个细胞/组织培养平板的孔接种。以80ng/mL添加SEB。用5 $\mu$ g/ml单独的可溶性抗人IgG1(hIgG1)、1F5或BMS-986215Ab处理细胞,或与0.1 $\mu$ g/ml的纳武单抗串联滴定(对于PD-1阻断),或与伊匹单抗串联滴定(对于CTLA-4阻断)。将没用SEB或Ab处理的PBMC(仅有细胞)用作对照。

[0310] 结果显示于图10中。相对于未用PD-1阻断,联合PD-1阻断时,通过BMS-986215的IL-2释放扩增了2倍。

[0311] BMS-986215降低了调节性T细胞对应答性T细胞的遏制

[0312] Forkhead box P3(Foxp3)<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T,称为调节性T细胞或Treg,遏制免疫应答,其可以允许肿瘤逃脱免疫监视。通常,Treg表达CD45RA或CD45RO。Treg可以遏制应答性T细胞(Tresp)。

[0313] 研究了BMS-986215对Treg介导的遏制的的作用。

[0314] 在第一个测定中,将CD45RA<sup>+</sup>Treg以50,000个细胞/组织培养平板的孔接种并通过每孔添加50,000个标记的Tresp进行1:2稀释。接着,每孔添加5,000个单核细胞衍生的树突细胞(MDDC),每孔含有0.3 $\mu$ g/mL可溶性muromonab-CD3(OKT3),一种抗人CD3 mAb。随后以10 $\mu$ g/ml添加可溶性BMS-986215或对照IgG1 Ab。将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育96h,并且通过荧光激活的细胞分选(FACS)测定了Treg:Tresp的比例和CD4<sup>+</sup>Tresp的增殖百分比。结果显示于图11(A)中。与对照IgG1 Ab相比,在2个实验中,BMS-986215将MDDC和可溶性OKT3存在下Treg介导的共同培养的CD4<sup>+</sup>Tresp的遏制逆转了超过70%。

[0315] 在第二个测定中,用3 $\mu$ g/mL OKT3和10 $\mu$ g/mL BMS-986215、1F5或抗KLH Ab包被96孔U-底平板。接着,每孔添加20,000个Trep。没有添加另外的IL-2。随后,添加了1 $\mu$ g/mL的可溶性抗CD28 Ab。将细胞培养7天并测定了Tresp和Foxp3<sup>+</sup>Treg细胞的数量。结果显示于图11(B)和(C)中。BMS-986215比Foxp3<sup>+</sup>Treg诱导了更高的Tresp扩增。

[0316] BMS-986215诱导了中等的ADCC活性,具有低水平的Fc效应子功能

[0317] 将BMS-986215、1F5或IgG1(对照)Ab加入作为效应细胞的原代自然杀伤(NK)细胞

和作为靶细胞的激活的T细胞或Ramos细胞中,效应子与靶的比例为10:1 (n=8)。对于T细胞的结果显示于图12中。BMS-986215诱导了20-44%的T细胞或Ramos细胞的裂解,表明了ADCC活性的中等诱导。

[0318] Fc效应子功能分析证明了低水平的ADCP、CDC和C1q结合活性(数据未显示)。

[0319] 使用或未用抗PD-1, BMS-986215没有介导来自8个正常人供体的新鲜全血样品中的自发细胞因子分泌(数据未显示)。

[0320] CD70加强了BMS-986215对人T细胞的激动活性

[0321] 将CD4<sup>+</sup>T细胞和CHO-OKT3细胞的共同培养物用于测定在Fc $\gamma$ R不存在下BMS-986215对T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌的作用。简而言之,将人CD4<sup>+</sup>T细胞与CHO-OKT3细胞(表达源自抗CD3 OKT3 mAb的单链抗CD3 scFv Ab的CHO细胞)共同培养。用BMS-986215、1F5或hIgG1(对照)Ab处理了共同培养物,使用或未用10 $\mu$ g/ml可溶性人CD70(shCD70),并分析了T细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌。测定的示意图显示于图13(A)中。

[0322] 结果描绘于图13中,其显示了BMS-986215,而不是1F5,证明了在Fc $\gamma$ R不存在下并且未用shCD70,通过增强T细胞增殖(B)和IFN- $\gamma$ 分泌(C)的弱激动剂活性。BMS-986215,而不是1F5,加强了人T细胞的激活,如通过可溶性CD70蛋白诱导T细胞增殖(D)和IFN- $\gamma$ 分泌(E)所测量的。

[0323] 实施例6

[0324] 临床前药代动力学,受体占用率预测和毒理学

[0325] BMS-986215在食蟹猴中的药代动力学和毒理学

[0326] 表6总结了在食蟹猴单次静脉0.2和4mg/kg剂量后BMS-986215的药代动力学(PK)参数。对于0.2mg/kg剂量,在约6小时后,和对于4mg/kg剂量,在约24小时后,达到了C<sub>max</sub>。随着研究剂量增加20倍,全身清除率(CLT)从2.2降至0.39mL/h/kg。结果,半衰期(t<sub>1/2</sub>)从2.2天增加到14天。此外,在血清样品中还检测到了0.2mg/kg的抗药物Ab(ADA)。这表明靶标介导的药物处置(TMDD)和可能的ADA可能有助于在猴中用BMS-986215观察到的非线性PK。BMS-986215与食蟹猴T细胞结合的EC<sub>50</sub>约为5ng/mL。

[0327] 在每个剂量水平下,将BMS986215以1.6mL/kg静脉内施用于三只猴子;为了药代动力学比较,两只猴子施用了载体。用于评价的标准包括临床观察、血液学、PK、CD27受体占用(R0)、循环sCD27水平、淋巴细胞子集分析、细胞因子水平和ADA测定。在给药前并以不同间隔直至给药后42天获得了血样。总体而言,没有不良发现,包括无不良临床观察和血液学参数无变化。循环sCD27水平有时间和剂量依赖性增加。在0.2mg/kg下大约7天以及在4mg/kg下在研究期间(42天)检测到了CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞上的BMS-986215CD27 R0高于90%。循环淋巴细胞子集(包括CD4<sup>+</sup>, Treg (Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup>T, CD20<sup>+</sup>B和NK细胞)或循环细胞因子水平无明显变化。

[0328] 表6:食蟹猴中静脉内施用后BMS-986215的药代动力学参数

	剂量 (mg/kg)	AUC(INF) ( $\mu\text{g/mL}\times\text{天}$ )	$T_{1/2}$ (天)	CLT (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)
[0329]	0.2	$3.9 \pm 0.8$	$2.2 \pm 1.9$	$2.2 \pm 0.5$	$127 \pm 14$
	4	$441 \pm 101$	$14 \pm 4$	$0.39 \pm 0.08$	$183 \pm 19$

[0330] 通过非区隔方法计算PK参数。值是平均 $\pm$ SD。(N=3)

[0331] BMS-986215在猴中全血CD27受体占用率的药代动力学/药效学建模

[0332] 通过猴子PK/R0研究确定全血中的CD27 R0,并使用 $E_{\max}$ 模型将其与血清BMS-986215浓度联系起来,如下所示:

$$[0333] \quad RO = \frac{E_{\max} \times C_p}{EC_{50} + C_p}$$

[0334] 其中 $E_{\max}$ 是最大R0(对于BMS-986215,固定在100%); $EC_{50}$ 是对应于 $E_{\max}$ 的50%的血清浓度。与猴全血中CD27 R0的50%相对应的估计的体内血清 $EC_{50}$ 为 $0.08 \pm 0.03\text{nM}$ ,与体外结合亲和力和 $EC_{50}$ ( $0.13 \pm 0.07\text{nM}$ , $n=3$ )相一致。

[0335] 人药代动力学和受体占用率预测

[0336] 从猴数据设计BMS-986215的人PK参数。由于非线性PK,因此可以通过考虑非靶标-和靶标-介导的消除过程来预测人清除率,如下所示:

$$[0337] \quad CL_{\text{tot}} = CL_{\text{非靶标介导}} + CL_{\text{靶标介导}}$$

[0338] 靶标介导的清除率可以使用以下等式来描述:

$$[0339] \quad CL_{\text{靶标介导}} = \frac{V_{\max}}{K_m + C_p}$$

[0340] 其中 $V_{\max}$ 是最大的靶标介导的消除率, $K_m$ 是对应于 $V_{\max}$ 的50%的血清药物浓度,且 $C_p$ 是血浆药物浓度。对于非靶标介导的清除率,使用0.85的幂指数,将异速生长率测定法用于从猴子到人类缩放。对于靶标介导的清除率,猴与人之间的 $V_{\max}$ 和 $K_m$ 均假定相同。还使用异速生长率测定法预测了人稳态分布体积,幂指数为1。结果,对于Q3W方案,预测0.1和1mg/kg剂量下的人 $t_{1/2}$ 分别为2和11天。如果ADA在人类中起最小作用,则预测的 $t_{1/2}$ 可能会更长。

[0341] 总之,BMS-986215在食蟹猴中呈现出非线性PK,末端 $t_{1/2}$ 为2.2至14天。非线性PK可归因于靶标介导的药物处置(TMDD),并且可能归因于ADA的形成。

[0342] 目前,使用血浆浓度可以很容易地预测人的外周血受体占用率(RO)。基于在猴子中使用BMS-986215观察到的对CD27 R0的良好体外-体内相关性,预测对于BMS-986215,每3周给予0.7mg/kg的人剂量可在低谷达到高于90%的R0。

[0343] 实施例7

[0344] CD27和CD70在人癌症中的表达

[0345] 多种人类癌症中的CD27表达的免疫组织化学分析

[0346] 为了鉴定潜在的疾病适应症,使用常规的全尺寸福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)切片,使用市售抗CD27 mAb,克隆137B4,通过免疫组织化学(IHC)研究了多种癌症类型中的CD27表达谱和分布。六种肿瘤类型和每种肿瘤类型的22-55个样品,即乳腺癌(BrC, $n=35$ ),

宫颈癌(CC, n=23), 结直肠腺癌(CRC, n=22), 头颈鳞状细胞癌(HNSCC, n=46), 肝细胞癌(HCC, n=55) 和卵巢腺癌(OvC, n=27), 进行了IHC染色。此外, 在大部分情况下(n=13-37个样品), 使用商业抗CD70 mAb在相邻切片中评估了CD70表达。

[0347] 在所有检查的肿瘤类型中, 在肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)子集中观察到了CD27<sup>+</sup>染色。通常, CD27<sup>+</sup>TIL呈现出与CD3<sup>+</sup>TIL非常相似的模式。在极少数情况下, CD27<sup>+</sup>TIL明显比CD3<sup>+</sup>TIL丰富, 这表明CD27在T细胞之外还在B细胞中表达。在这6种肿瘤类型中, HNSCC和CC显示出最高水平的CD27<sup>+</sup>TIL, 其次是CRC、BrC和HCC, 而OvC显示出最低水平。

[0348] 在小部分TIL中观察到CD70<sup>+</sup>染色, 并且其频率明显低于CD27<sup>+</sup>染色。在6种肿瘤类型中, CC、HCC和CRC显示出CD70<sup>+</sup>TIL水平高于HNSCC、BrC和OvC。除了检测TIL上的CD70表达, 在约30%的CC和15%的OvC病例中, 肿瘤细胞中还显示出CD70<sup>+</sup>标记。然而, 在那些CD70<sup>+</sup>肿瘤细胞病例中, 大部分是非常低的表达。使用10%的肿瘤细胞<sup>+</sup>作为截留值, 约15%的CC病例被认为是阳性的。

[0349] CD27和CD70表达的TGGA分析

[0350] 正如其他共刺激和检查点受体所观察到的, Cancer Genome Atlas (TCGA) 数据库的分析表明了CD27在大多数肿瘤中以与其他T细胞特征相关的方式在RNA水平表达。淋巴瘤是例外, 其中CD27由恶性B细胞表达。CD27表达本身与生存没有显著相关, 宫颈癌和头颈癌除外, 其中高表达与提高的生存率相关(分别为p=0.00001和0.01)。B淋巴瘤后, CD27表达最高的肿瘤是甲状腺、肾细胞、肺和头颈。

[0351] 在宫颈癌TCGA数据集中, 在高CD27表达人群中, 高CD70表达者比低CD70表达者具有更好的生存, 这表明使用BMS-986215提高的CD27激动作用将提供益处。

[0352] 可溶性CD27

[0353] 提出了可溶性CD27 (sCD27) 可能是免疫细胞激活的标志物, 在临床试验中可以作为药效学(PD)标志物使用(Huang等, 2013)。因此, 测试了I-IV期黑色素瘤、CRC、RCC和肺癌患者血清中的sCD27水平, 并与正常健康志愿者(NHV)血清样本中的非癌对照进行比较。与NHV(2000-7000pg/mL)相比, 癌症患者中的某些个体在其血清中的sCD27水平高2至3倍(2000-15,000pg/mL)。这与文献报道的不同并且更高, 在文献中报道了sCD70在癌症患者(150pg/mL)相对于NHV(500pg/mL)较低。

[0354] 在用抗CD27 mAb治疗的食蟹猴中, 发现了sCD27水平升高, 即使检测外周T细胞激活的测定结果未显示出激活或增殖增加。因此, 抗CD27治疗后进到的sCD27升高很可能是FcRn介导的循环t<sub>1/2</sub>延长的结果。

[0355] 实施例8

[0356] 小鼠肿瘤研究

[0357] 为了证明非配体阻断性CD27 mAb在小鼠肿瘤模型中具有抗肿瘤活性, 如实施例1所述制备了大鼠抗小鼠CD27 mAb, 并选择了克隆8H5作为可以用作BMS-986215替代品的配体非阻断性激动剂Ab。这种替代抗CD27 Ab以0.25nM的亲和力结合mCD27, 没有阻断小鼠CD70结合, 在小鼠脾T细胞上呈现出激动活性, 并使用mIgG1和mIgG2a Fc变体工程化。因此, 8H5是BMS-986215的合适替代品。

[0358] 克隆8H5在实体和血液鼠肿瘤模型中都证明了抗肿瘤活性, 尤其是与PD-1检查点阻联合时。参见, 例如, 图14显示了在CT26小鼠结肠癌模型中的结果, 并且表7总结了在SA1N

纤维肉瘤、CT26和EGT T细胞淋巴瘤小鼠模型中获得的结果。与mIgG2a和mIgG1, D265A对照(图14(A))相比, 8H5的mIgG1同种型在CT26模型中仅显示了中等程度的抗肿瘤活性, 具有21%的肿瘤生长抑制(TGI; 图14(B))。8H5的mIgG2a同种型显示出略高但仍然是中等的抗肿瘤活性(图14(C)), mIgG1和IgG2a同种型在10只治疗的小鼠中均未产生无肿瘤(TF)小鼠。

[0359] 还测试了抗mPD-1Ab, 4H2与mIgG1-D265A同种型的抗肿瘤活性。4H2是从大鼠IgG2a抗小鼠PD-1Ab构建的嵌合大鼠-小鼠抗mPD-1Ab, 其中Fc部分被来自不同小鼠IgG同种型的Fc部分替代(WO 2006/121168)。在CT26肿瘤模型中, 4H2显示出中等程度的抗肿瘤活性, 在10只治疗的小鼠中产生27%的TGI和2只TF小鼠(图14(D))。这种抗PD-1活性被8H5增强, 通过以下情况得到了证明: 与8H5, mIgG1联合产生了70% TGI和3/10TF小鼠(图14(E); 表7), 以及与8H5, mIgG2a联合产生了76% TGI和4/10TF小鼠(图14(F); 表7)。这证明了抗CD27在降低体内癌细胞生长方面与检查点抑制剂(如抗PD-1)相互协同作用。如果组合的抗肿瘤作用大于每个Ab单独呈现的抑制水平之和, 则认为Ab组合具有协同作用。

[0360] 改变T细胞表面受体特异性的Ab的同种型(共刺激和共抑制两者)可以潜在地改变这些Ab的抗肿瘤活性。用表达为mIgG1和mIgG2a(激活Fc $\gamma$ R结合剂)mAb的单药8H5治疗带有肿瘤的小鼠时, 在SA1N纤维肉瘤模型中观察到了有效的抗肿瘤活性。8H5的mIgG1同种型显示出有效的抗肿瘤活性, 在12只治疗的小鼠中产生了52%的TGI和8只TF小鼠(表7)。8H5的mIgG2a同种型甚至更有效, 在12只治疗的小鼠中产生了98%的TGI和11只TF小鼠(表7)。单一疗法的活性与肿瘤部位的CD8<sup>+</sup>T细胞的扩增和Treg的耗竭有关。最近的临床前研究表明, 激动剂CD27 Ab与PD-1阻断联合时, 提高了抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的活性, 这在根除肿瘤中是有效的(Ahrends等, 2016)。抗小鼠CD27同种型与抗小鼠PD-1联合, 在CT26模型中显示出相当的抗肿瘤活性水平, 如通过第25天的TGI(分别为70%和76% TGI)和无肿瘤(TF)小鼠的总数(分别为3/10和4/10TF)测量的。参见表7。

[0361] 除部分Treg耗竭外, 与肿瘤部位相比, 用8H5 mIgG1或8H5 mIgG2a治疗的小鼠的外周(例如, 血液和脾脏)CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞数量减少。肿瘤内的用mIgG1观察到的CD8<sup>+</sup>T细胞扩增比mIgG2a同种型更多, 而mIgG2a似乎在消除Treg方面更有效。这些数据表明抗CD27同种型变体主要通过Treg耗竭(mIgG2a)和/或CD8<sup>+</sup>T细胞的扩增(mIgG1)来产生抗肿瘤活性。这些研究证明了CD27激动剂和PD-1阻断导致同系肿瘤模型中的肿瘤负担降低并提高了生存率。参见表7。

[0362] 抗mCD27 mAb 8H5的mIgG1和mIgG2a同种型均未显示出对抗鼠EG7 T细胞淋巴瘤细胞的抗肿瘤活性, 而抗PD1 mAb 4H2仅表现出非常中等的活性(表7)。然而, 在该淋巴瘤模型中, 8H5 mIgG1与4H2协同联合产生了44% TGI和1/10TF小鼠(表7)。

[0363] 表7: 在各种小鼠肿瘤模型中使用抗小鼠CD27作为单一疗法或联合其他药剂的临床前功效研究概括

	肿瘤	mAbs	结果
[0364]	纤维肉瘤 SA1N <sup>a</sup>	抗-mCD27 8H5 mIgG1 抗-mCD27 8H5 mIgG2a	<b>单一疗法</b> 52% TGI, 8/12 TF 98% TGI, 11/12 TF <b>MOA:</b> 在肿瘤部位, 使用mIgG2a, Treg耗竭, 和使用mIgG1, CD8 <sup>+</sup> T 细胞扩增
[0365]	结肠 CT26 <sup>b</sup>	抗-mCD27 8H5 mIgG1 抗-mCD27 8H5 mIgG2a 抗-mPD-1 4H2 mIgG1-D265A  4H2 mIgG1-D265A + 8H5 mIgG1 4H2 mIgG1-D265A + 8H5 mIgG2a	<b>单一疗法</b> 21% TGI, 0/10 TF 24% TGI, 0/10 TF 27% TGI, 2/10 TF  <b>联合疗法</b> 70% TGI, 3/10 TF 76% TGI, 4/10 TF <b>MOA:</b> 在肿瘤部位, 使用mIgG1扩增了CD8 T细胞和使用mIgG2a肿瘤部位的Treg耗竭
	淋巴瘤 EG7 <sup>c</sup>	抗-mCD27 8H5 mIgG1 抗-mCD27 8H5 mIgG2a 抗-mPD-1 4H2 mIgG1-D265A  4H2 mIgG1-D265A + 8H5 mIgG1 4H2 mIgG1-D265A + 8H5 mIgG2a	<b>单一疗法</b> 0% TGI, 0/10 TF 0% TGI, 0/10 TF 8% TGI, 1/10 TF  <b>联合疗法</b> 44%, TGI, 1/10 TF 0% TGI, 0/10

[0366] <sup>a</sup>AJ小鼠中的数据

[0367] <sup>b</sup>BALB/c小鼠中的数据

[0368] <sup>c</sup>C57BL/6小鼠中的数据

[0369] 缩写:TGI=接种后第21-28天的肿瘤生长抑制;TF=研究结束时无肿瘤参考文献

[0370] Abhinandan KR, Martin AC (2008) Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. Mol Immunol 45: 3832-9.

[0371] Ahrends T, Bąbala N, Xiao Y等 (2016) CD27 agonism plus PD-1 blockade

recapitulates CD4<sup>+</sup>T cell help in therapeutic anti-cancer vaccination. *Cancer Res* 76 (10) :2921-31.

[0372] Al-Lazikani, Lesk AM, Chothia C (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273 (4) :927-48.

[0373] Baitsch L, Legat A, Barba L, Fuertes Marraco SA, Rivals JP等 (2012) Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PloS One* 7 (2) :e30852.

[0374] Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J等 (2010) Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28:3167-75.

[0375] Brahmer JR, Hammers H, Lipson EJ (2015) Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity. *Future Oncol* 11 (9) :1307-26.

[0376] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL等 (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366:2455-65.

[0377] Buchan SL, Manzo T, Flutter B等 (2015) OX40- and CD27-mediated costimulation synergizes with anti-PD-L1 blockade by forcing exhausted CD8<sup>+</sup>T cells to exit quiescence. *J Immunol* 194:125-33.

[0378] Buchan SL, Fallatah M, Thirdborough SM, Taraban VY, Rogel A等 (2018) PD-1 blockade and CD27 stimulation activate distinct transcriptional programs that synergize for CD8<sup>+</sup>T-cell driven anti-tumor immunity. *Clin Cancer Res* 24 (10) :2383-94.

[0379] Bullock T, McClintic H, Jeong S等 (2014) Immune correlates of varlilumab (CDX-1127) treated cancer patients are consistent with CD27 costimulatory activity. Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) 29th Annual Meeting, November 6-9, 2014, National Harbor, MD; Celldex Poster P115.

[0380] Callahan M, Postow MA, Wolchok JD (2016) Targeting T cell co-receptors for cancer therapy. *Immunity* 44 (5) :1069-78.

[0381] Chakravarthi B VSK, Nepal S, Varambally S (2016) Genomic and epigenomic alterations in cancer. *Am J Pathol* 186 (7) :1724-35.

[0382] Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39 (1) ,1-10.

[0383] Chothia C, Lesk AM (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196:901-17.

[0384] Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill JS等 (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342:877-83.

[0385] De Colvenaer V, Taveirne S, Delforche M等 (2011) CD27-deficient mice show

normal NK-cell differentiation but impaired function upon stimulation. *Immunol Cell Biol* 89:803-11.

[0386] Dolfi DV, Boesteanu AC, Petrovas C等(2008) Late signals from CD27 prevent Fas-dependent apoptosis of primary CD8<sup>+</sup>T cells. *J. Immunol* 180:2912-21.

[0387] Drugs.com-Opdivo Approval History: <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>, last accessed April 1, 2019.

[0388] Farkona等(2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* 14:73.

[0389] French RR, Taraban VY, Crowther GR等(2007) Eradication of lymphoma by CD8 T cells following anti-CD40 monoclonal antibody therapy is critically dependent on CD27 costimulation. *Blood* 109:4810-5.

[0390] Gorelik L, Avgerinos G, Kunes Y, Marasco WA (2017) Preclinical characterization of a novel fully human IgG1 anti-PD-L1 mAb CK-301. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting, Apr 1-5, 2017, *Cancer Res* 77 (13Suppl): Abstract No. 4606.

[0391] Guo L, Zhang H, Chen B (2017) Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) inhibitor for targeted immunotherapy in tumor. *J Cancer* 8(3):410-6.

[0392] He LZ, Prostak N, Thomas LJ等(2013) Agonist anti-human CD27 monoclonal antibody induces T cell activation and tumor immunity in human CD27-transgenic mice. *J Immunol* 191:4174-83.

[0393] Hendriks J, Gravestain LA, Tesselaar K等(2000) CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 1:433-40.

[0394] Herbst RS, Soria JC, Kowanzetz M, Fine GD, Hamid O等(2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515:563-7.

[0395] Hollinger P, Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotech* 23(9):1126-36.

[0396] Huang J, Jochems C, Anderson AM等(2013) Soluble CD27-pool in humans may contribute to T cell activation and tumor immunity. *J. Immunol.* 190:6250-8.

[0397] Huang R, Chen G (2014) Higher order structure characterization of protein therapeutics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406:6541-58.

[0398] Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T (2017) Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci* 24(1):26.

[0399] Jones LM, Sperry JB, Carroll JA, Gross ML (2011) Fast photochemical oxidation of proteins for epitope mapping. *Anal Chem* 83:7657-61.

[0400] Kabat EA, Wu TT, Bilofsky H, Reid-Miller M, Perry H (1983) Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda: National Institute of Health; 1983. 323

- [0401] Kabat EA,Wu TT,Perry H,Gottesman K,Foeller C(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开No.91-3242.
- [0402] Kabat EA,Wu TT,Reid-Miller M,Perry H,Gottesman K(1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fourth Edition,U.S.Government Printing Office,NIH公开No.165-492.
- [0403] Kamta J,Chaar M,Ande A,Altomare DA,Ait-Oudhia S(2017) Advancing cancer therapy with present and emerging immuno-oncology approaches.Front Oncol 18 (7) :64.
- [0404] Kaufman RJ,Sharp PA(1982) Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNAGene.Mol Biol 159:601-21.
- [0405] Lefranc MP,Pommie C,Ruiz M,Giudicelli V,Foulquier E等(2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains.Dev Comp Immunol 27:55-77.
- [0406] Lesokhin AM,Callahan MK,Postow MA,Wolchok JD(2015) On being less tolerant:enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation.Sci Transl Med 7(280):280sr1.
- [0407] Lipson EJ,Sharfman WH,Drake CG,Wollner I,Taube JM等(2013) Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody.Clin Cancer Res 19:462-8.
- [0408] Liu SY,Wu YL(2017) Ongoing clinical trials of PD-1 and PD-L1 inhibitors for lung cancer in China.J Hematol Oncol 10(1):136.
- [0409] Mahoney KM,Rennert PD,Freeman GJ(2015) Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets.Nat Rev Drug Discov 14(8):561-84.
- [0410] Martin A,Cheetham JC,Rees AR(1989) Modeling antibody hypervariable loops:a combined algorithm.Proc Natl Acad Sci USA 86(23):9268-72.
- [0411] MacCallum RM.,Martin ACR,Thornton JT(1996) Antibody-antigen interactions:contact analysis and binding site topography.J Mol Biol 262:732-45.
- [0412] Mellman I,Coukos G,Dranoff(2011) Cancer immunotherapy comes of age.Nature 480:480-9.
- [0413] Munitic I,Kuka M,Allam A等(2013) CD70 deficiency impairs effector CD8 T cell generation and viral clearance but is dispensable for the recall response to lymphocytic choriomeningitis virus.J Immunol 190:1169-79.
- [0414] Olafsen T,Wu AM(2010) Antibody vectors for imaging.Semin Nucl Med 40(3):167-81.
- [0415] Ott PA,Hodi FS,Kaufman HL,Wigginton JM,Wolchok JD(2017) Combination

immunotherapy:a road map.J Immunother Cancer 5:16.

[0416] Pardoll DM(2012)The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy.Nat Rev Cancer 12:252-64.

[0417] PCT公开No.WO 2008/156712,公开于2008年12月24日2008,Organon NV.

[0418] PCT公开No.WO 2012/145493,公开于2012年10月26日,Amplimmune,Inc.

[0419] PCT公开No.WO 2013/173223,公开于2013年11月21日,Bristol-Myers Squibb Co.

[0420] PCT公开No.WO 2014/179664,公开于2014年11月6日,AnaptysBio,Inc.

[0421] PCT公开No.WO 2014/194302,公开于2014年12月4日,Sorrento Therapeutics, Inc.

[0422] PCT公开No.WO 2014/206107,公开于2014年12月31日,Shanghai Junshi Biosciences Inc.

[0423] PCT公开No.WO 2015/035606,公开于2015年3月19日,Beigene,Ltd.

[0424] PCT公开No.WO 2015/085847,公开于2015年6月18日,Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co.,Ltd.

[0425] PCT公开No.WO 2015/112800,公开于2015年7月30日,Regeneron Pharmaceuticals,Inc.

[0426] PCT公开No.WO 2015/112900,公开于2015年07月30日,Dana-Farber Cancer Institute,Inc.和Novartis AG

[0427] PCT公开No.WO 2016/106159,公开于2016年6月30日,Enumeral Biomedical Holdings,Inc.

[0428] PCT公开No.WO 2006/121168,公开于2006年11月16日,ONO Pharmaceutical Co., Ltd.和Medarex,Inc.

[0429] PCT公开No.WO 2016/149201,公开于2016年9月22日,Cytomx Therapeutics,Inc.

[0430] PCT公开No.WO 2016/197367,公开于2016年12月15日,Wuxi Biologics (Shanghai)Co.Ltd.

[0431] PCT公开No.WO 2017/020291,公开于2017年2月9日,Wuxi Biologics (Shanghai) Co.Ltd.

[0432] PCT公开No.WO 2017/020858,公开于2017年2月9日,Wuxi Biologics (Shanghai) Co.Ltd.

[0433] PCT公开No.WO 2017/024465,公开于2017年2月16日,Innovent Biologics (Suzhou)Co.,Ltd.

[0434] PCT公开No.WO 2017/024515,公开于2017年2月16日,Wuxi Biologics (Cayman) Inc.

[0435] PCT公开No.WO 2017/025016,公开于2017年2月16日,Innovent Biologics (Suzhou)Co.,Ltd.

[0436] PCT公开No.WO 2017/025051,公开于2017年2月16日,Wuxi Biologics (Cayman) Inc.

[0437] PCT公开No.WO 2017/034916,公开于2017年3月2日,Eli Lilly and Co.

- [0438] PCT公开No.WO 2017/040790,公开2017年3月9日,Agenus Inc.
- [0439] PCT公开No.WO 2017/106061,公开于2017年6月22日,Macrogenics,Inc.
- [0440] PCT公开No.WO 2017/123557,公开于2017年7月20日,Armo Biosciences,Inc.
- [0441] PCT公开No.WO 2017/132827,公开于2017年8月10日,Innovent Biologics (Suzhou) Co.,Ltd.
- [0442] PCT公开No.WO 2017/133540,公开于2017年8月10日,Innovent Biologics (Suzhou) Co.,Ltd.
- [0443] Pianko MJ,Liu Y,Bagchi S,Lesokhin AM(2017) Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies:a review.Stem Cell Investig 4:32.
- [0444] Ramakrishna V,Sundarapandiyam K,Zhao B等(2015) Characterization of the human T cell response to in vitro CD27 costimulation with varlilumab.J Immunother Cancer 3:37.
- [0445] Roberts DJ,Franklin NA,Kingeter LM等(2010) Control of established melanoma by CD27 stimulation is associated with enhanced effector function and persistence,and reduced PD-1 expression,of tumor infiltrating CD8<sup>+</sup>T cells.J Immunother 33:769-79.
- [0446] Sakanishi T,Yagita H(2010) Anti-tumor effects of depleting and non-depleting anti-CD27 mAbs in immune-competent mice.Biochem Biophys Res Commun393:829-35.
- [0447] Salzer E,Daschkey S,Choo S等(2013) Combined immunodeficiency with life-threatening EBV-associated lymphoproliferative disorder in patients lacking functional CD27.Haematologica 98:473-8.
- [0448] Sanchez PJ,McWilliams JA,Haluszczyk C等(2007) Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo.J Immunol 178:1564-72.
- [0449] Sanborn RE,Pishvaian MJ,Kluger HM,Callahan MK等(2017) Clinical results with combination of anti-CD27 agonist antibody,varlilumab,with anti-PD1 antibody nivolumab in advanced cancer patients.J Clin Oncol 35(15) Suppl.: 3007.
- [0450] Taraban VY,Rowley TF,Al-Shamkhani A(2004) Cutting edge:a critical role for CD70 in CD8 T cell priming by CD40-licensed APCs.J Immunol 173:6542-6.
- [0451] U.S. 专利No.6,808,710授权于2004年10月26日,Wood等
- [0452] U.S. 专利No.7,488,802授权于2009年2月10日,Collins等
- [0453] U.S. 专利No.7,943,743授权于2011年5月17日,Korman等
- [0454] U.S. 专利No.7,767,429授权于2010年8月3日,Bookbinder等
- [0455] U.S. 专利No.8,008,449授权于2011年8月30日,Korman等
- [0456] U.S. 专利No.8,168,757授权于2012年5月1日,Finnefrock等
- [0457] U.S. 专利No.8,217,149授权于2012年7月10日,Irving等
- [0458] U.S. 专利No.8,354,509授权于2013年1月15日,Carven等

- [0459] U.S. 专利No.8,779,108授权于2014年7月15日,Queva等
- [0460] U.S. 专利No.9,175,082授权于2015年11月3日,Zhou等
- [0461] U.S. 专利No.9,205,148授权于2015年12月8日,Langermann等
- [0462] U.S. 专利No.9,624,298授权于2017年4月18日,Nastri等
- [0463] U.S. 专利No.9,938,345授权于2018年4月10日,Papadopoulos等
- [0464] U.S. 专利No.9,987,500授权于2018年6月5日,Papadopoulos等
- [0465] U.S. 公开No.2015/0079109,公开于2015年3月19日,Li等
- [0466] U.S. 公开No.2016/0272708,公开于2016年9月22日,Chen等
- [0467] van Gisbergen KP,Klarenbeek PL,Kragten NA,等(2011)The costimulatory molecule CD27 maintains clonally diverse CD8(+)T cell responses of low antigen affinity to protect against viral variants.Immunity 35:97-108.
- [0468] van Montfrans JM,Hoepelman AI,Otto S等(2012)CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia.Allergy Clin Immunol 129:787-93.
- [0469] Wajant H(2016)Therapeutic targeting of CD70 and CD27.Expert Opin Ther Targets 15:1-15.
- [0470] Wang C,Thudium KB,Han M,Wang XT等(2014)In vitro characterization of the anti-PD-1antibody nivolumab,BMS-936558,and in vivo toxicology in non-human primates.Cancer Imm Res 2(9):846-56.
- [0471] Weber J(2010)Immune checkpoint proteins:a new therapeutic paradigm for cancer-preclinical background:CTLA-4and PD-1blockade.Semin Oncol 37(5):430-9.
- [0472] Wei H,Mo J,Tao L,Russell RG,Tymiak AA等(2014)Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics:methodology and applications.Drug Discov Today 19:95-102.
- [0473] Wolchok JD,Weber JS,Maio M,Neyns B,Harmankaya K等(2013)Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials.Ann Oncol 24(8):2174-80.
- [0474] Wu TT,Kabat EA(1970)An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity.J Exp Med 132:211-50.
- [0475] Yan Y,Chen G,Wei H,Huang R,Mo J等(2014)Fast photochemical oxidation of proteins(FPOP)maps the epitope of EGFR binding to adnectin.J Am Soc Mass Spec 25:2084-92.
- [0476] Yao S,Zhu Y,Chen L(2013)Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation.Nature Rev Drug Discov 12:130-46.
- [0477] Zhang F,Wei H,Wang X,Bai Y,Wang P等(2017)Structural basis of a novel
- [0478] PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade.Cell Discov 3:17004.

## 序列表

&lt;110&gt; Lu, Li-Sheng

&lt;120&gt; 抗-CD27抗体及其用途

&lt;130&gt; 13107-WO-PCT

&lt;160&gt; 21

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 260

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val  
 1           5           10           15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr  
           20           25           30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe  
           35           40           45

[0001]

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro  
           50           55           60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His  
           65           70           75           80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys  
           85           90           95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys  
           100           105           110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu  
           115           120           125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His  
           130           135           140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met  
           145           150           155           160

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr  
           165           170           175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile

180                    185                    190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala  
195                    200                    205

Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser  
210                    215                    220

Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu  
225                    230                    235                    240

Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro  
245                    250                    255

Ala Cys Ser Pro  
260

<210> 2  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VH CDR1 of BMS-986215

[0002]

<400> 2

Thr Thr Tyr Ala Met Asn  
1                    5

<210> 3  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> BMS-986215的VH CDR2

<400> 3

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr  
1                    5                    10                    15

Gly

<210> 4  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> BMS-986215的VH CDR3

<400> 4

Asp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 5  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> BMS-986215的VL CDR1

<400> 5

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 6  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> BMS-986215的VL CDR2

<400> 6

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

[0003]

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> BMS-986215的VL CDR3

<400> 7

Gln Gln Phe Asn Asn Tyr Pro Arg Thr  
1 5

<210> 8  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> BMS-986215的VH

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BMS-986215的VL

[0004]

<400> 9

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Asn Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Asn Tyr Pro Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 10

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BMS-986215的CH

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

[0005]

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
225                    230                    235                    240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                  245                    250                    255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                  260                    265                    270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
                  275                    280                    285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
                  290                    295                    300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305                    310                    315                    320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
                  325

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

[0006]

<213> 人工序列

<220>

<223> BMS-986215的CL

<400> 11

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1                    5                    10                    15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
                  20                    25                    30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
                  35                    40                    45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50                    55                    60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
65                    70                    75                    80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
                  85                    90                    95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 12  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> BMS-986215的重链

&lt;400&gt; 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
 50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

[0007]

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

[0008]

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

<210> 13  
 <211> 214  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BMS-986215的轻链

<400> 13

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
          35           40           45

Asn Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Asn Tyr Pro Arg  
          85           90           95

[0009]

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
          100           105           110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
          115           120           125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
          130           135           140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145           150           155           160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
          165           170           175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
          180           185           190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
          195           200           205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
          210

<210> 14

<211> 178  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 14

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly  
 1           5           10           15

Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys Asp  
          20           25           30

Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly  
       35           40           45

Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys  
       50           55           60

Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala  
 65           70           75           80

Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys Arg Asp Lys Glu  
          85           90           95

[0010] Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu Thr Ala Arg Ser  
          100           105           110

Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His Leu Pro Tyr Val  
       115           120           125

Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met Gln Thr Leu Ala  
       130           135           140

Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr His Trp Pro Pro  
 145           150           155           160

Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile His His His His  
       165           170           175

His His

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 15

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly  
 1           5           10           15

Lys Leu Cys Cys Gln  
20

<210> 16  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 16

His Tyr Trp Ala Gln Gly Lys  
1 5

<210> 17  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 17

Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys  
1 5 10

<210> 18  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 智人

[0011] <400> 18

Asp Cys Asp Gln His Arg  
1 5

<210> 19  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 19

Asn Gly Trp Gln Cys Arg  
1 5

<210> 20  
<211> 452  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 1F5重链

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20            25            30  
 Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
   35            40            45  
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
   50            55            60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
   65            70            75            80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
   85            90            95  
 Ala Arg Gly Ser Gly Asn Trp Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
  100            105            110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
  115            120            125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
  130            135            140  
 [0012] Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
  145            150            155            160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
  165            170            175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
  180            185            190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
  195            200            205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
  210            215            220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
  225            230            235            240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
  245            250            255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
  260            265            270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275            280            285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290            295            300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305            310            315            320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325            330            335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340            345            350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355            360            365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370            375            380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385            390            395            400

[0013] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405            410            415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420            425            430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435            440            445

Lys Gly Ser Ser  
450

<210> 21

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1F5轻链

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1            5            10            15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp  
20            25            30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Arg  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

[0014]

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

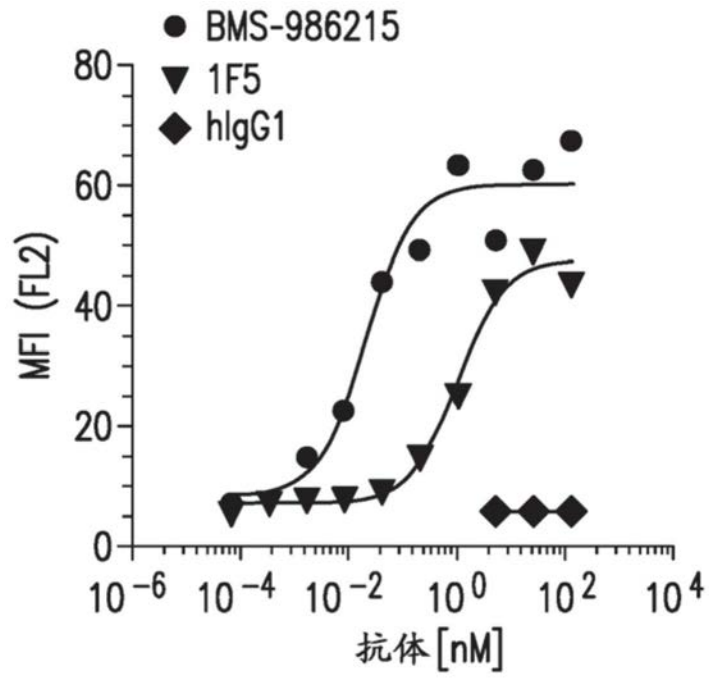


图1A

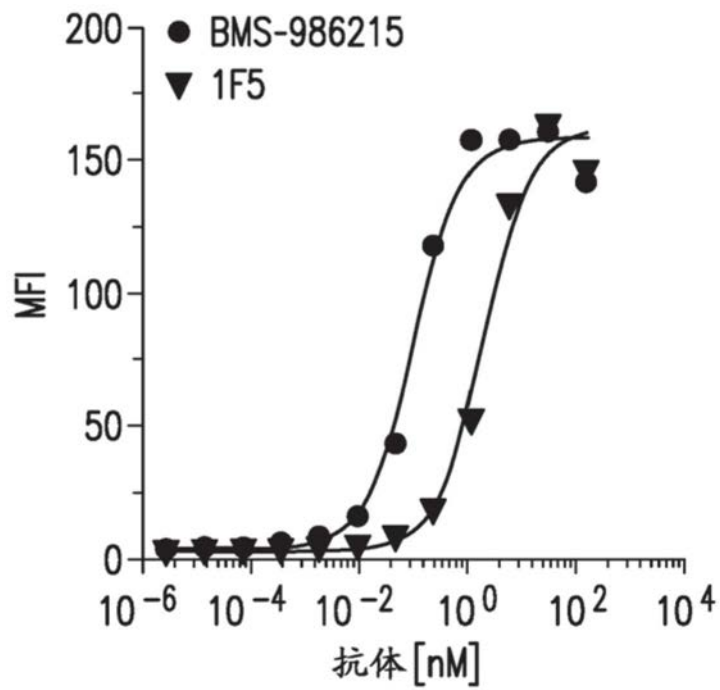


图1B

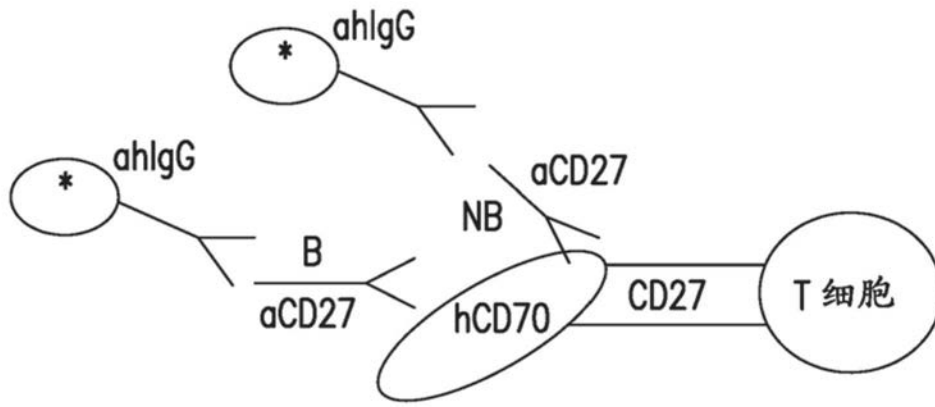


图2A

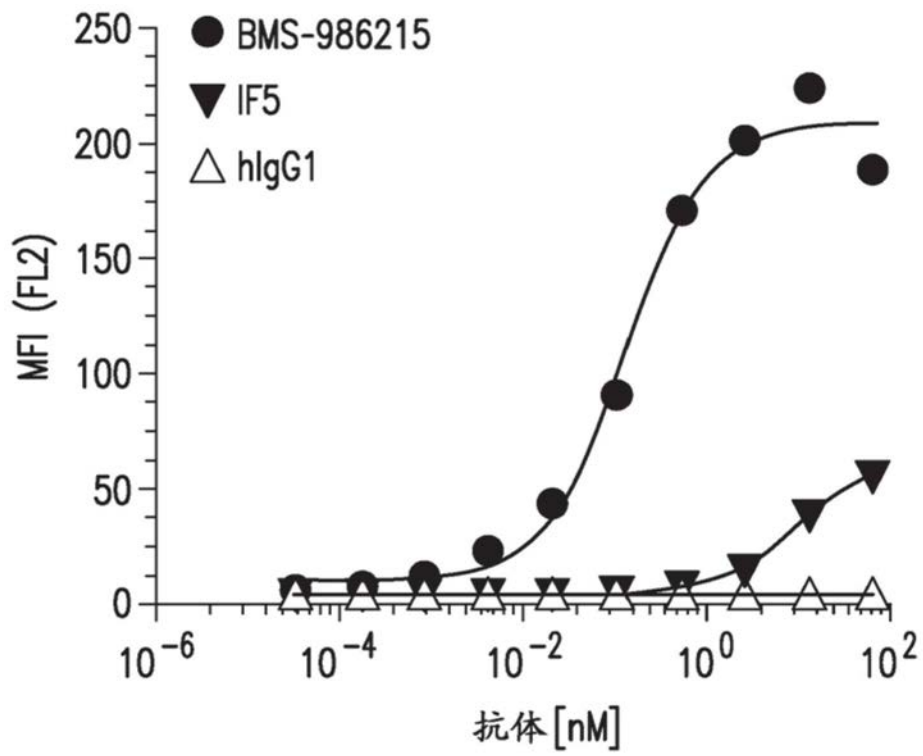


图2B

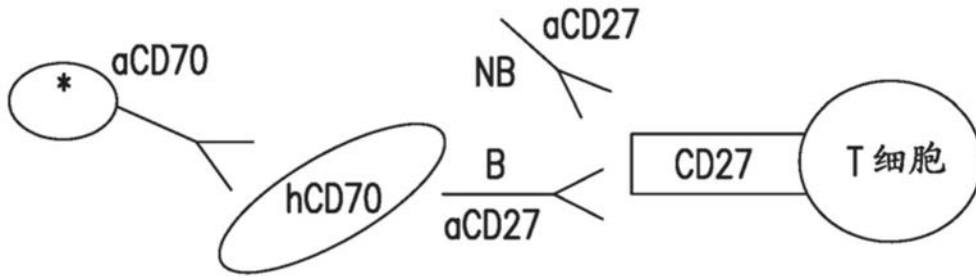


图2C

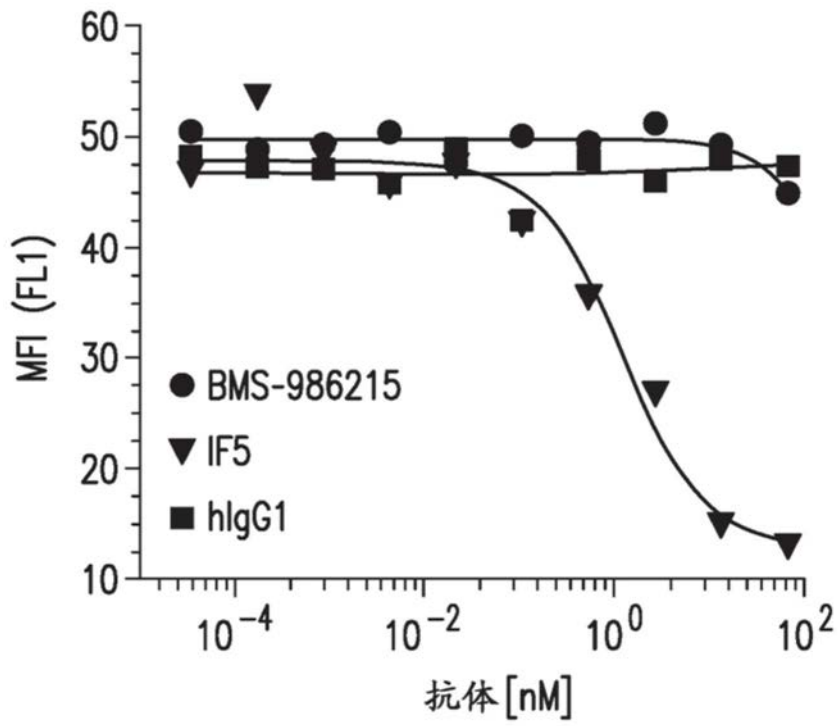


图2D



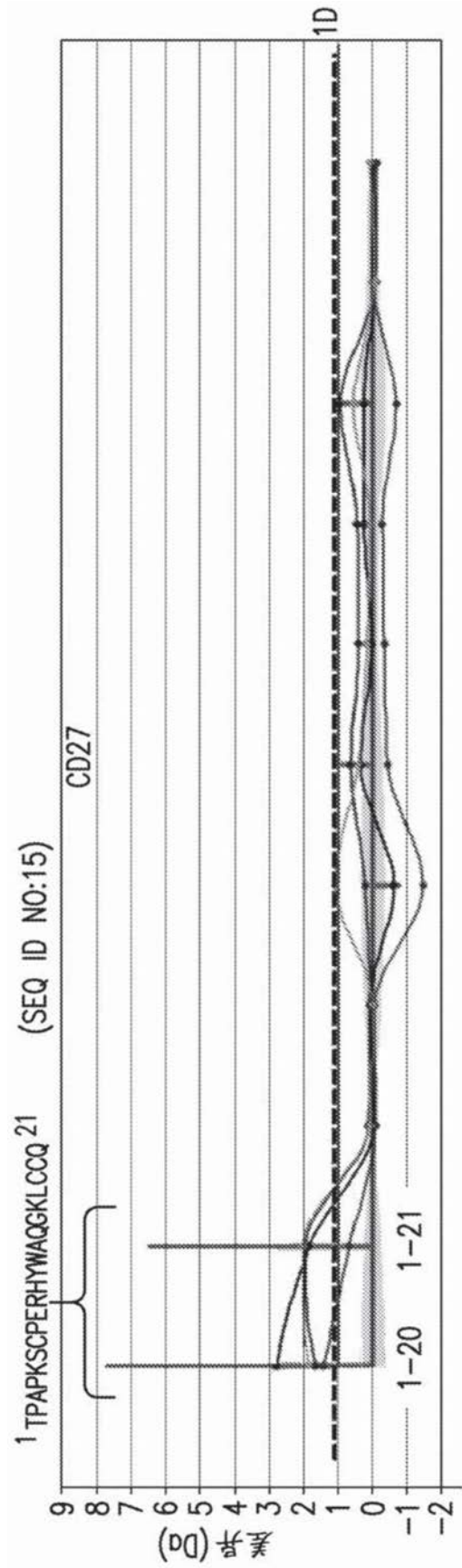


图3B

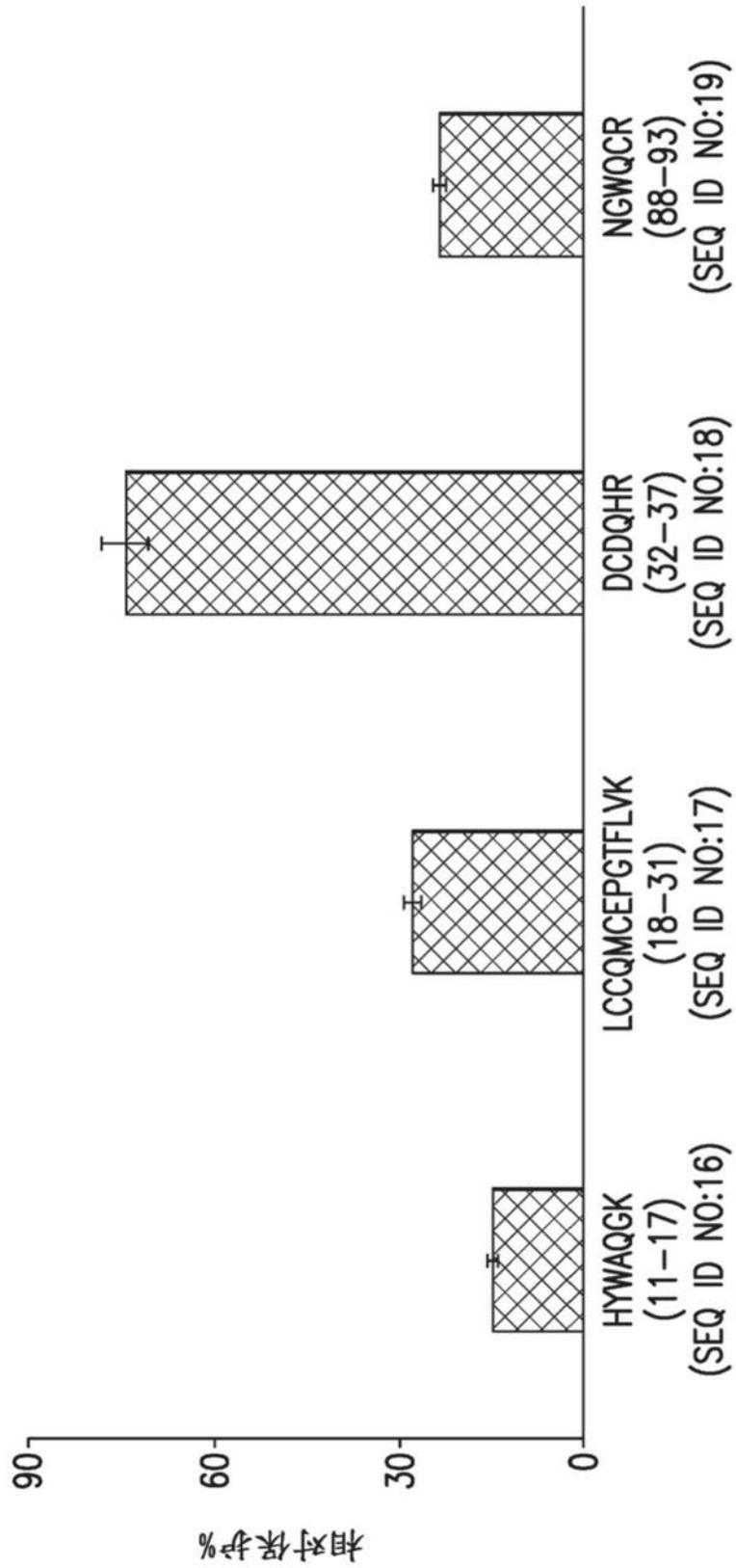


图3C

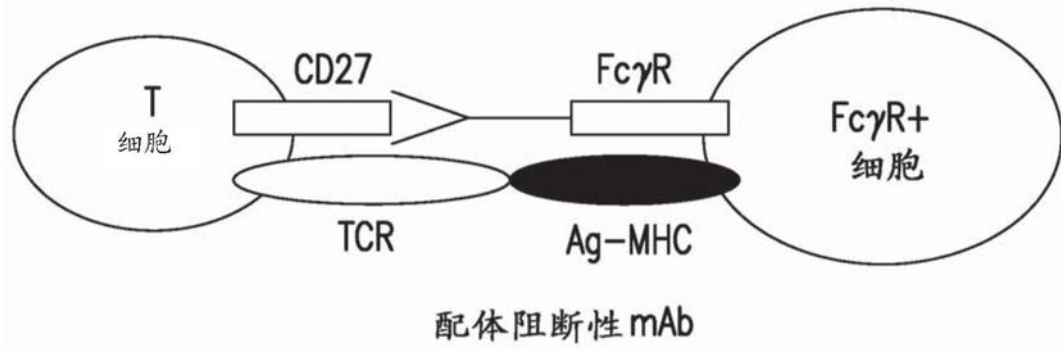


图4A

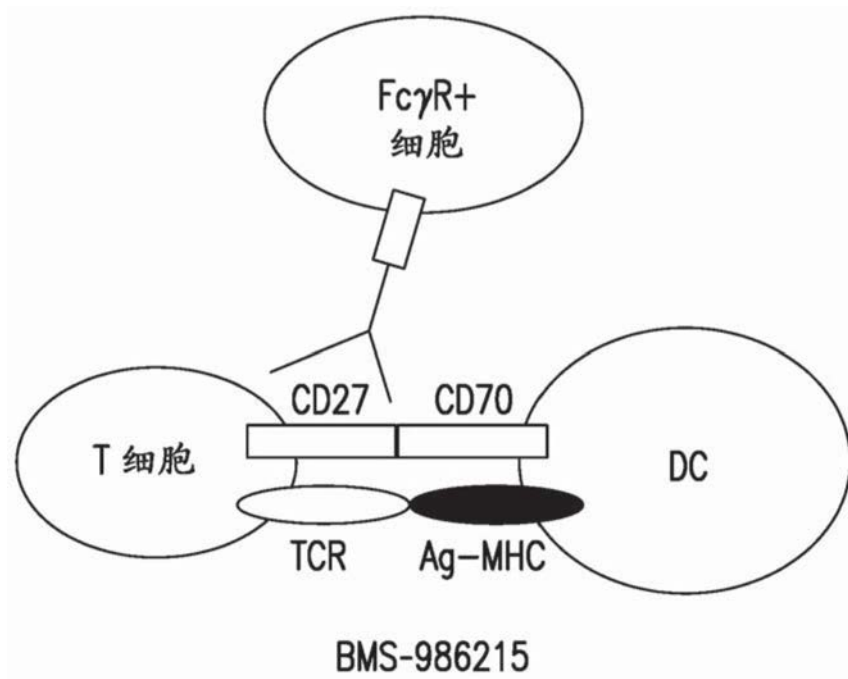


图4B

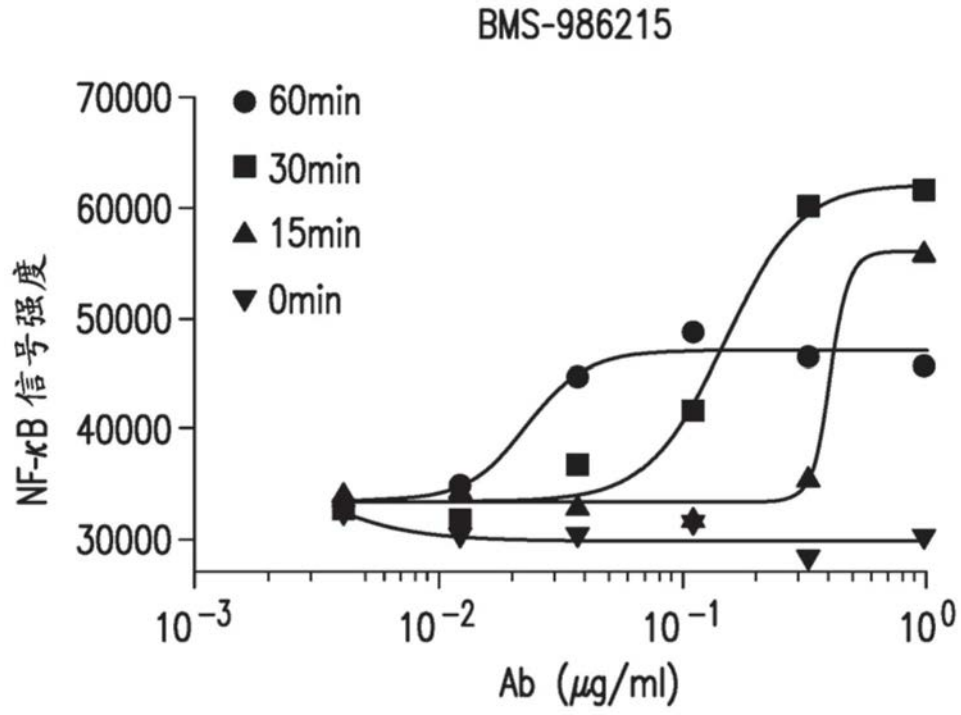


图5A

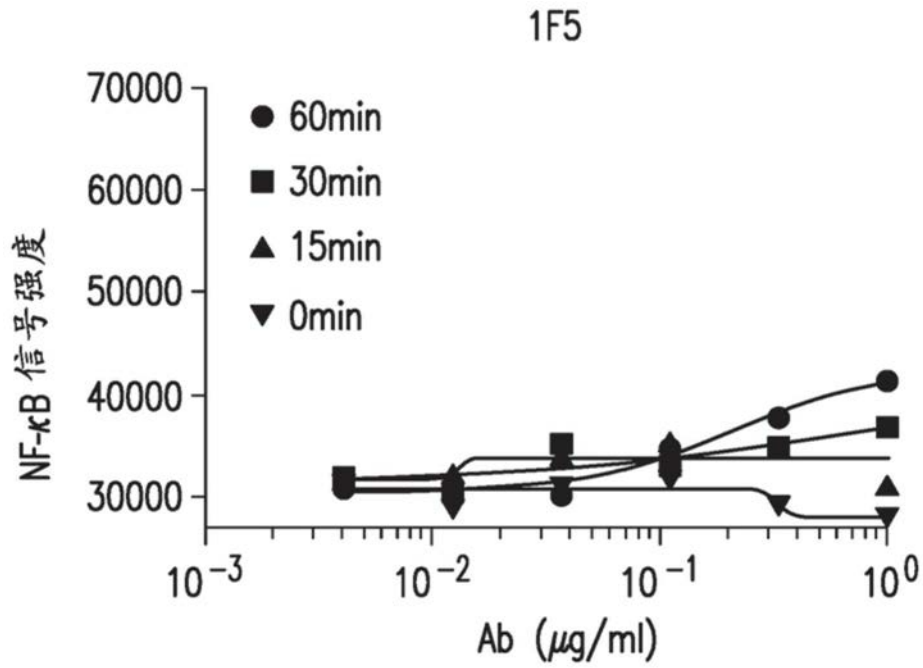


图5B

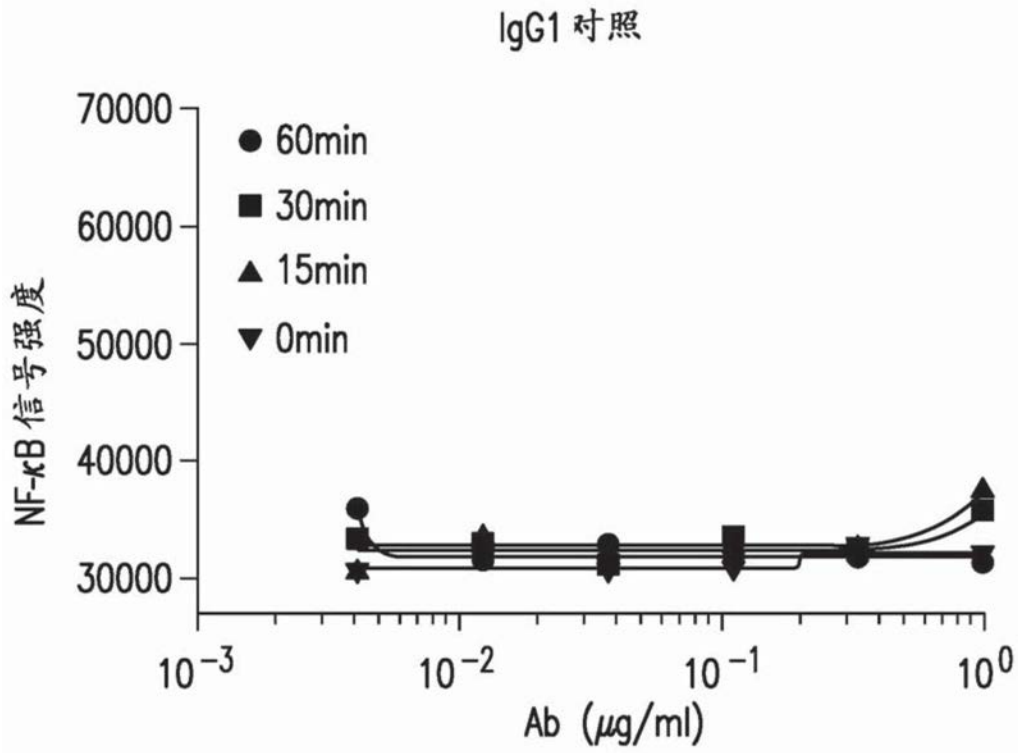


图5C

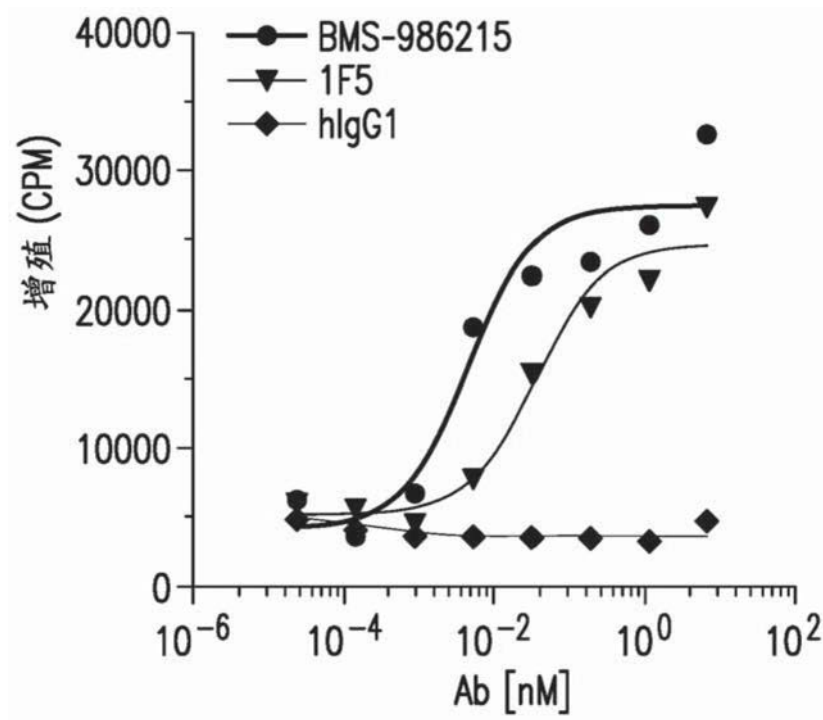


图6A

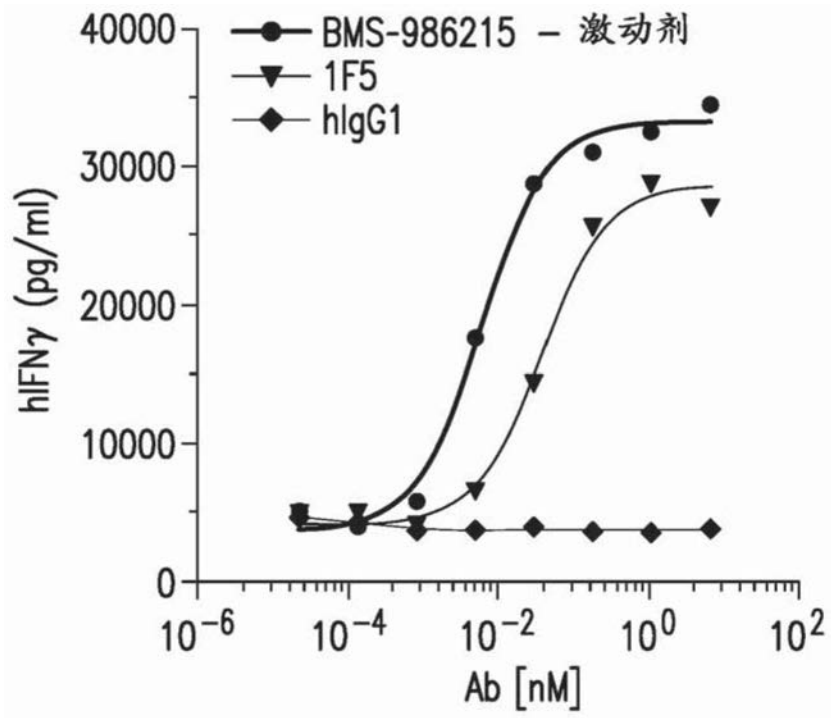


图6B

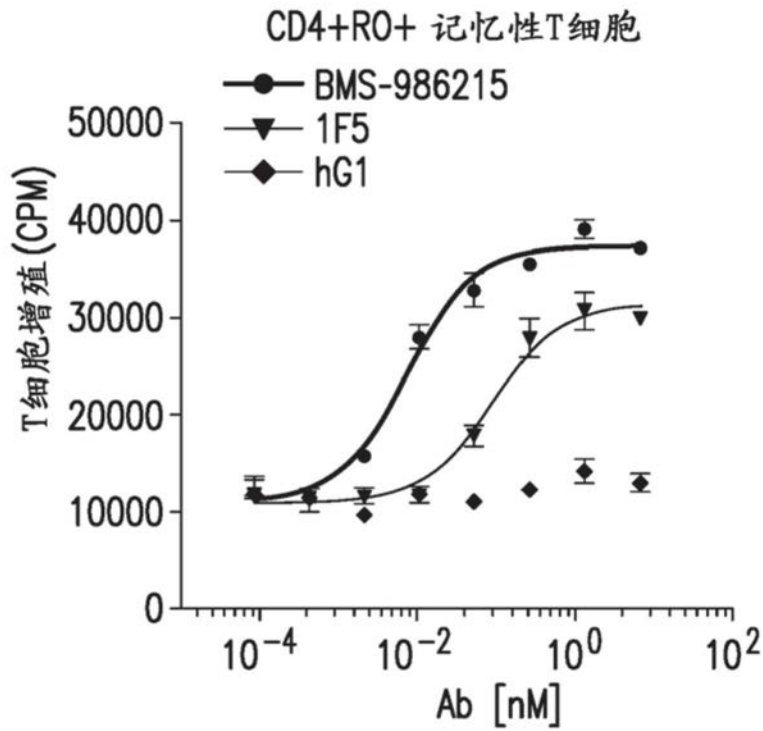


图7A

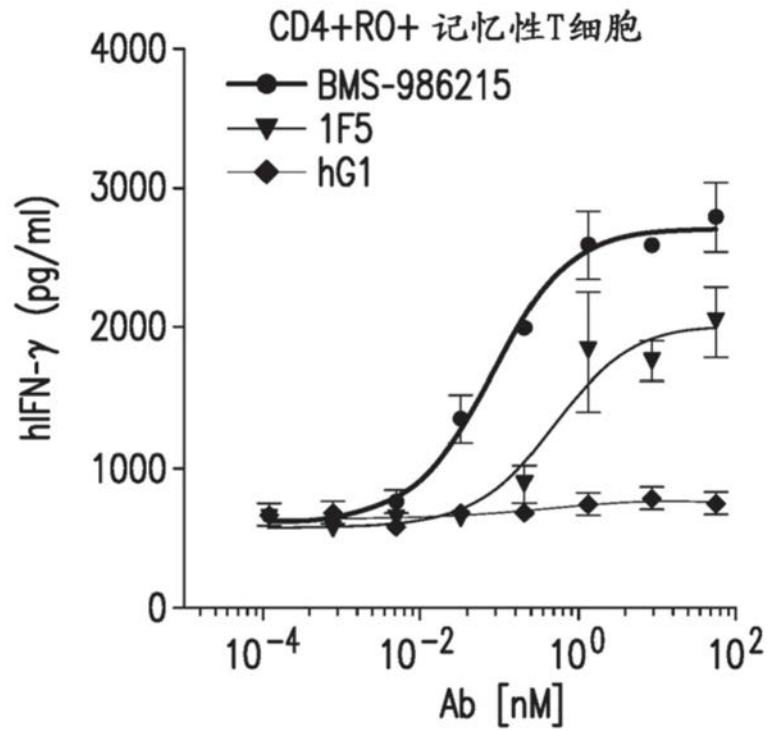


图7B

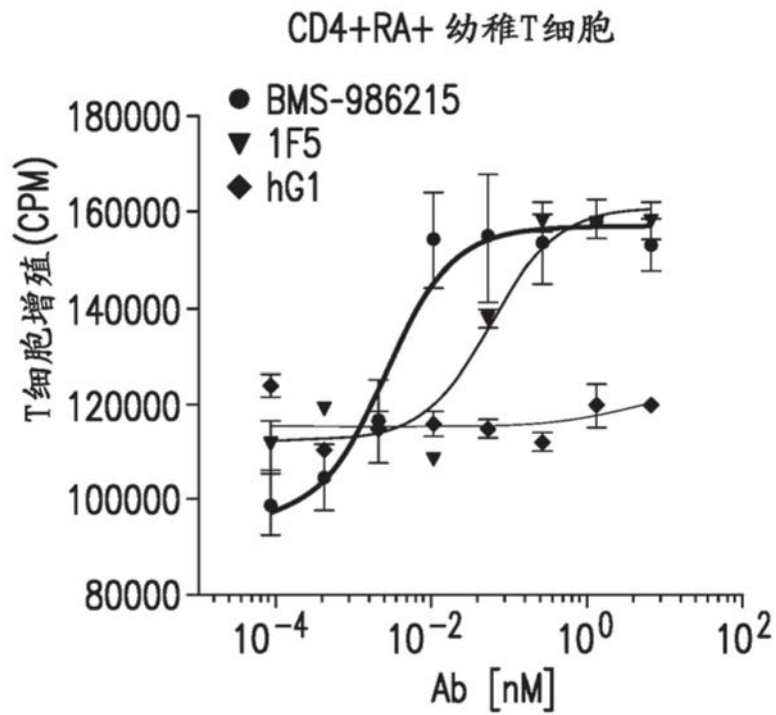


图7C

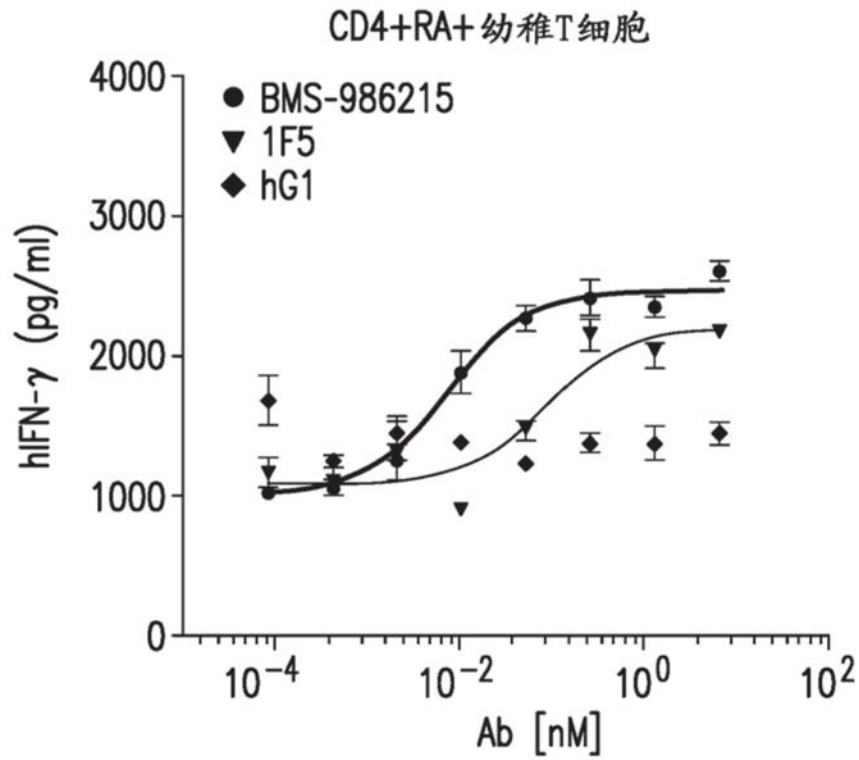


图7D

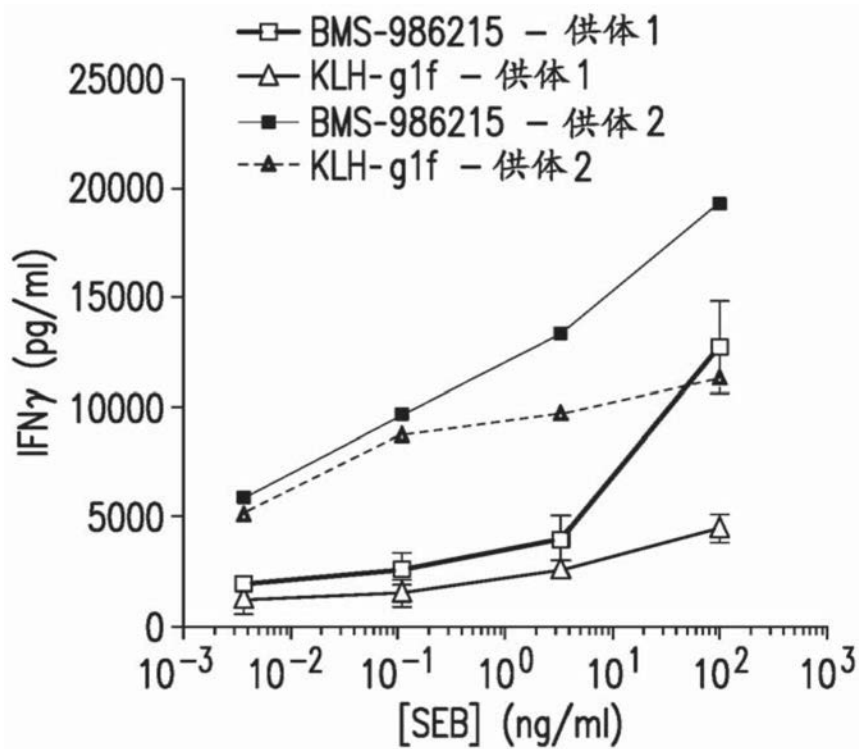


图8

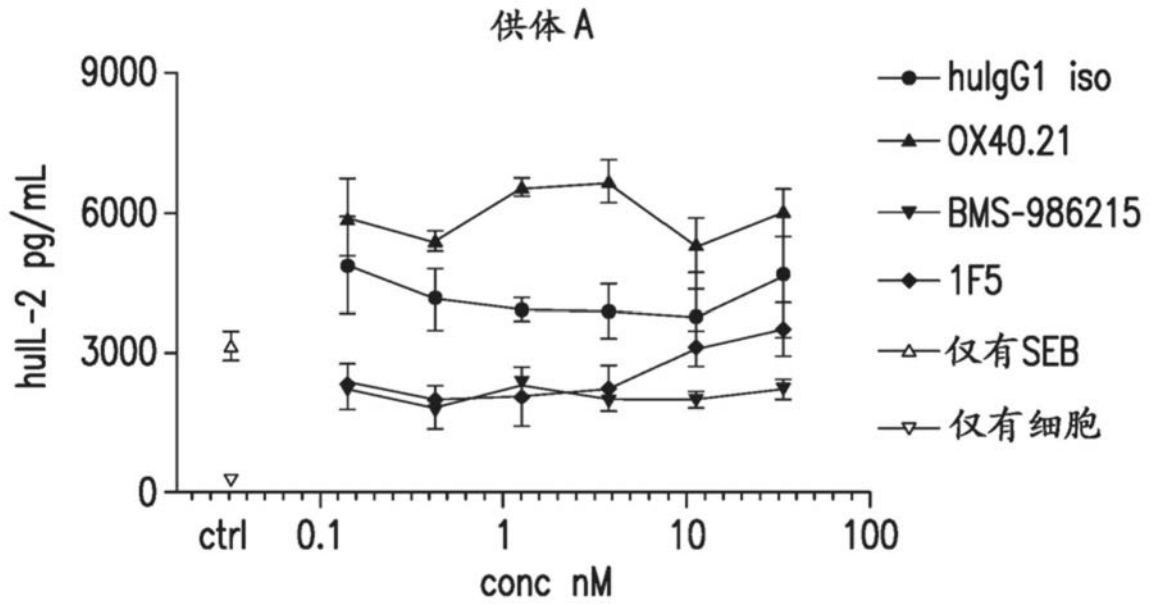


图9A

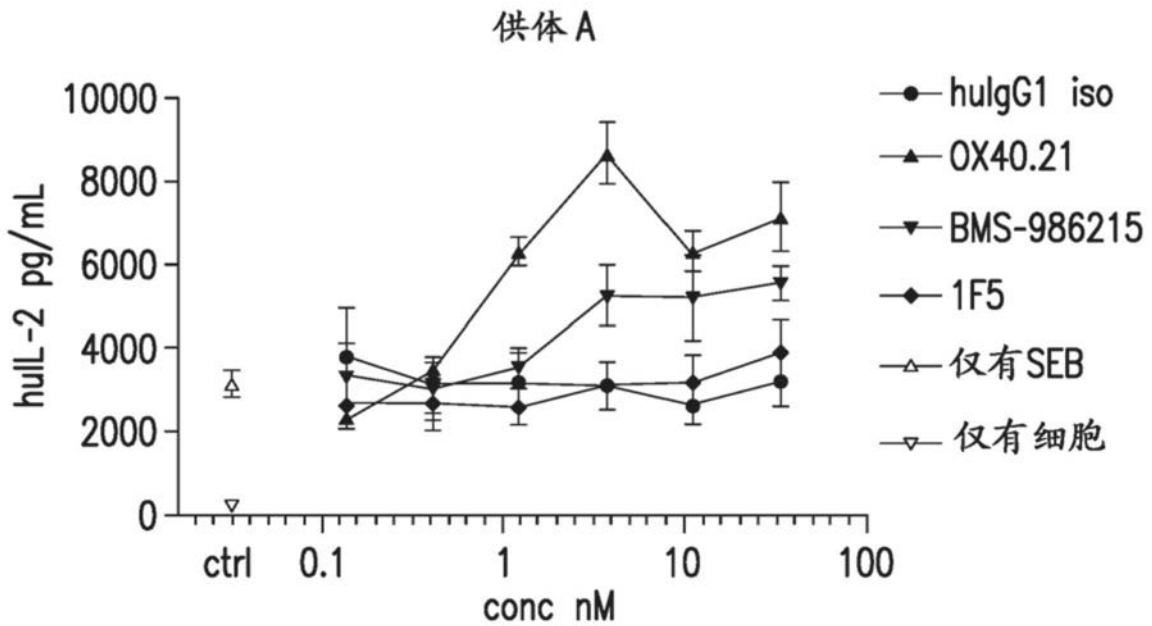


图9B

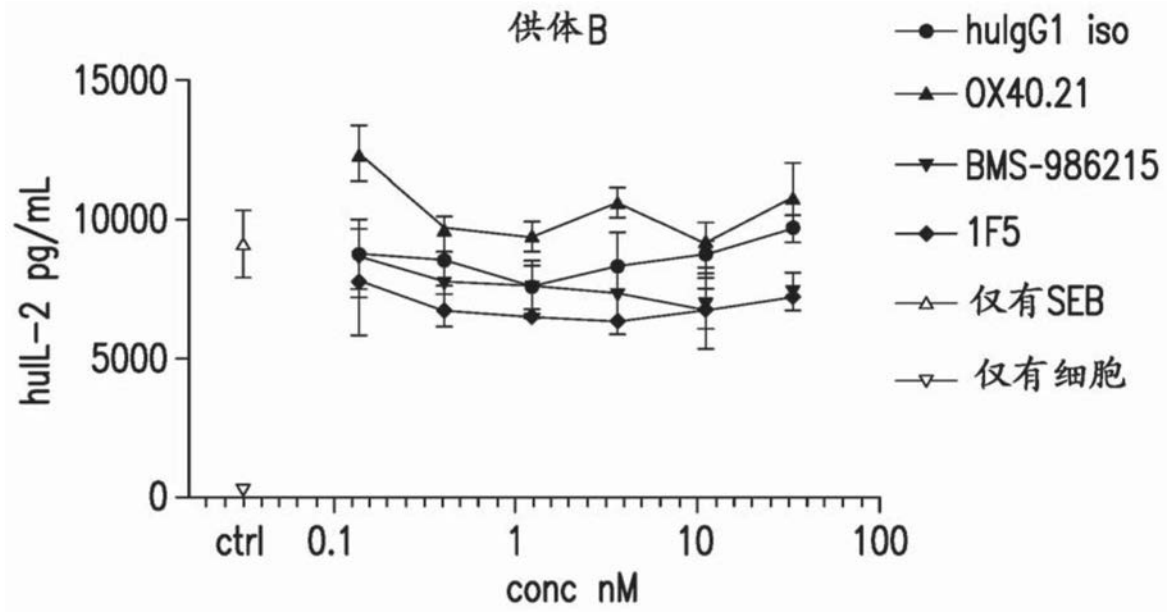


图9C

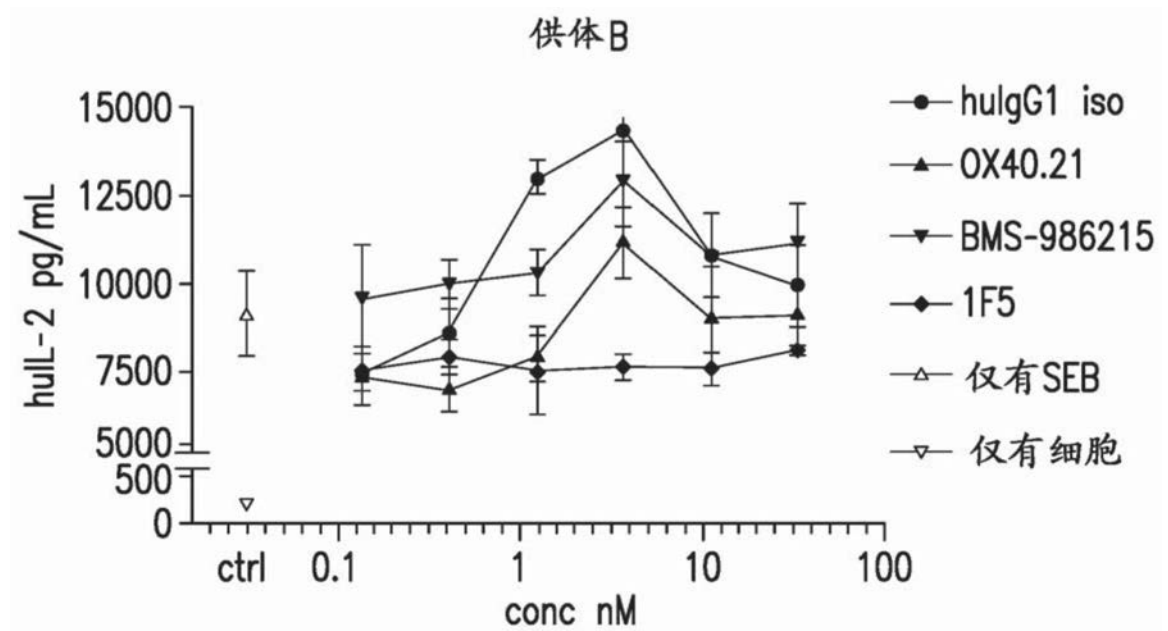


图9D

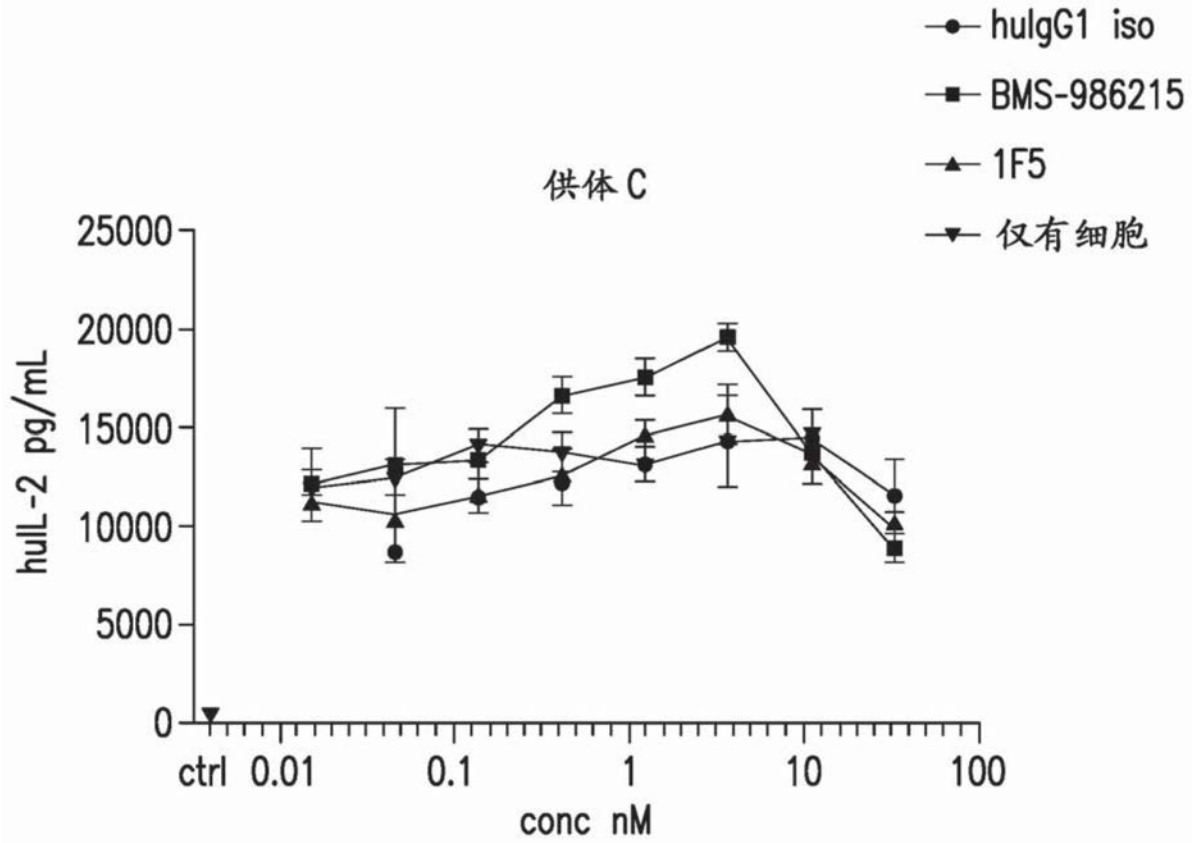


图9E

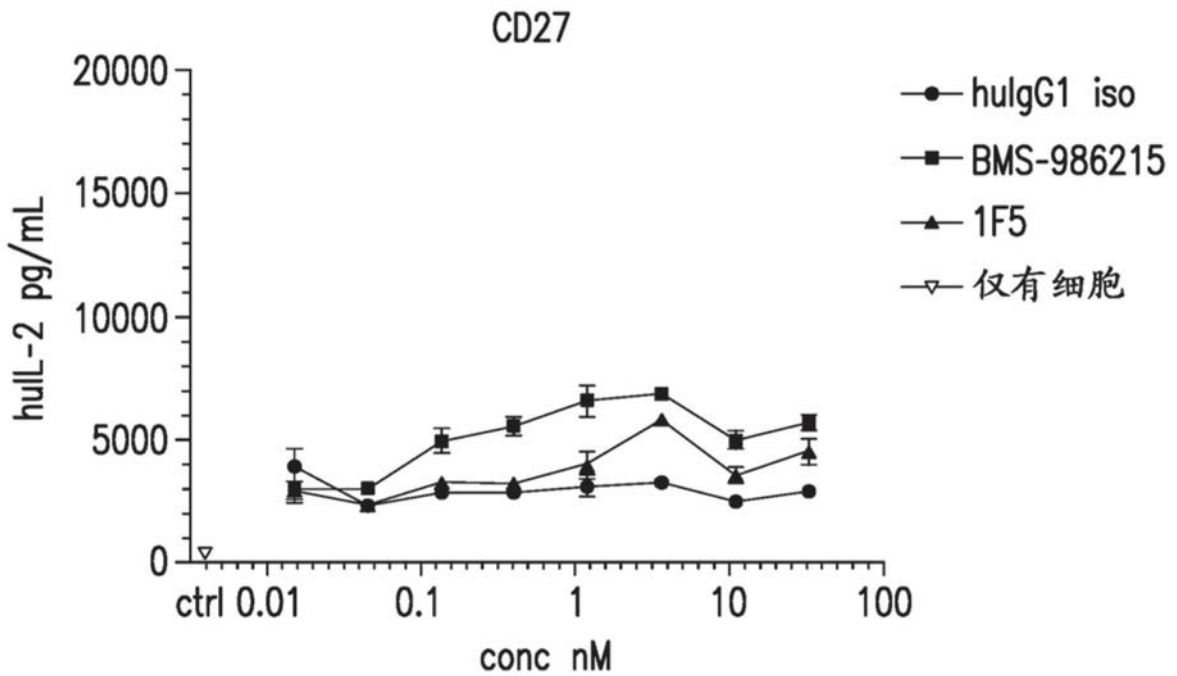


图10A

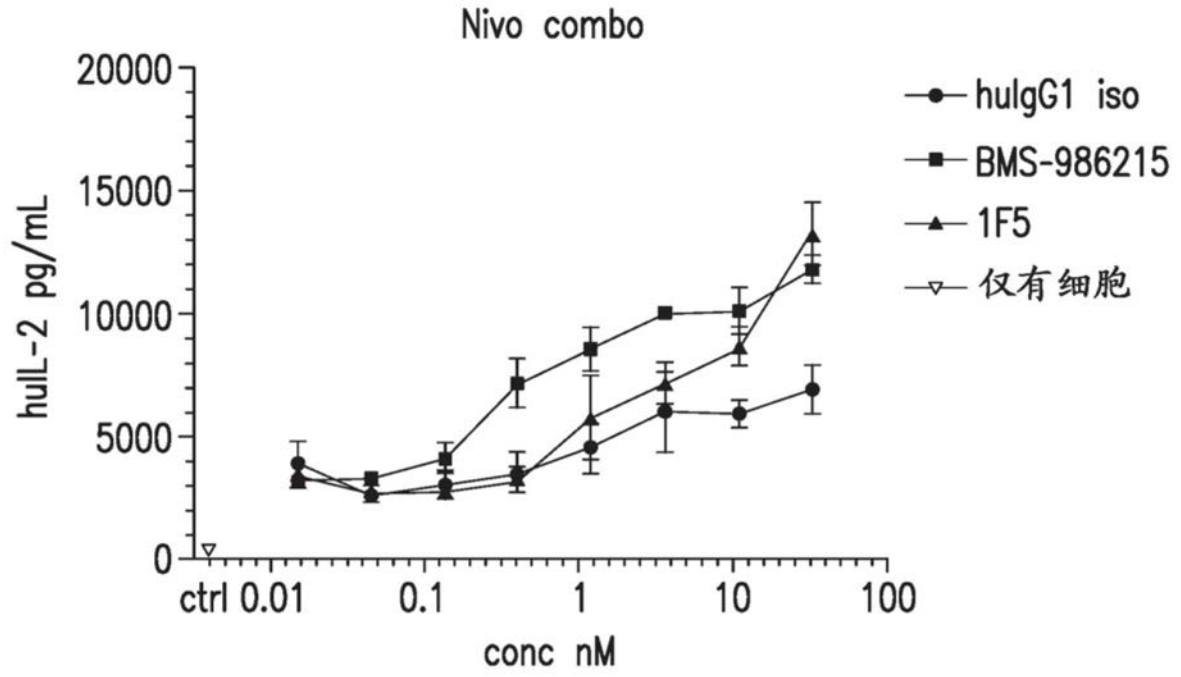


图10B

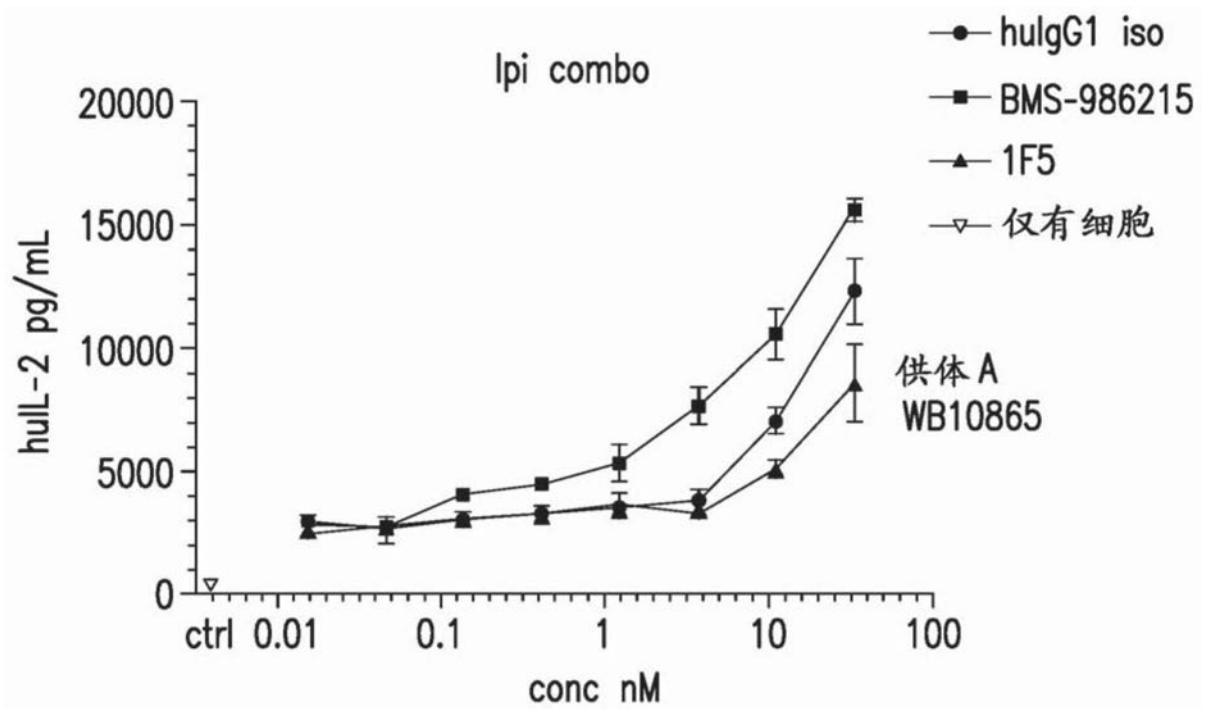


图10C

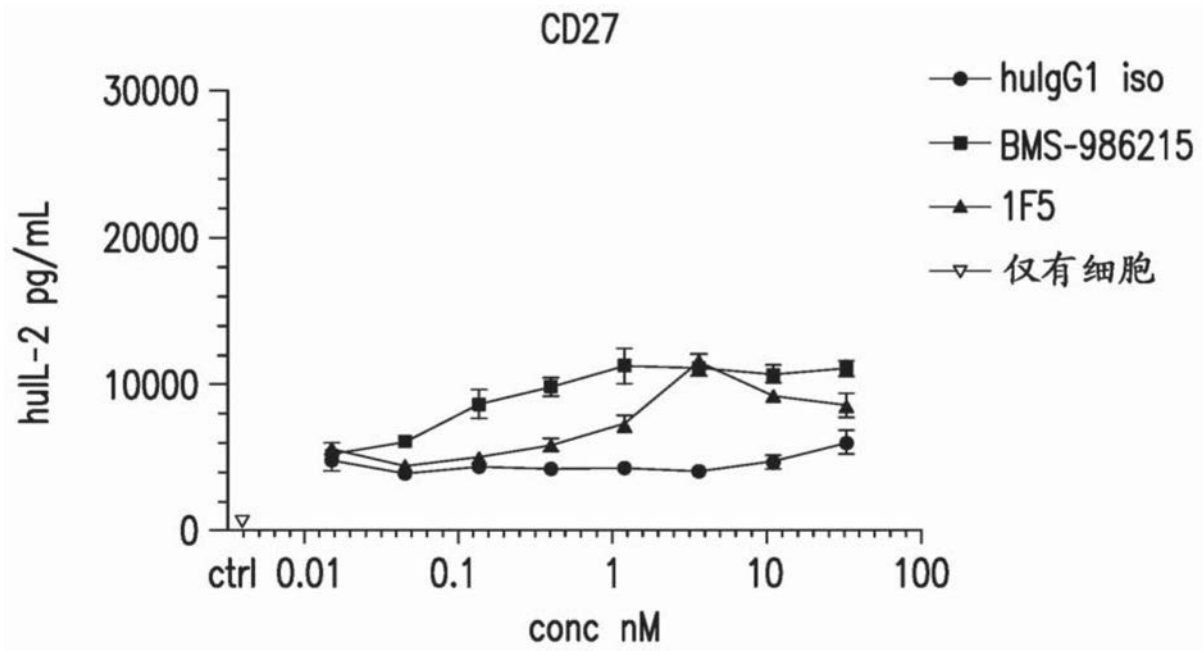


图10D

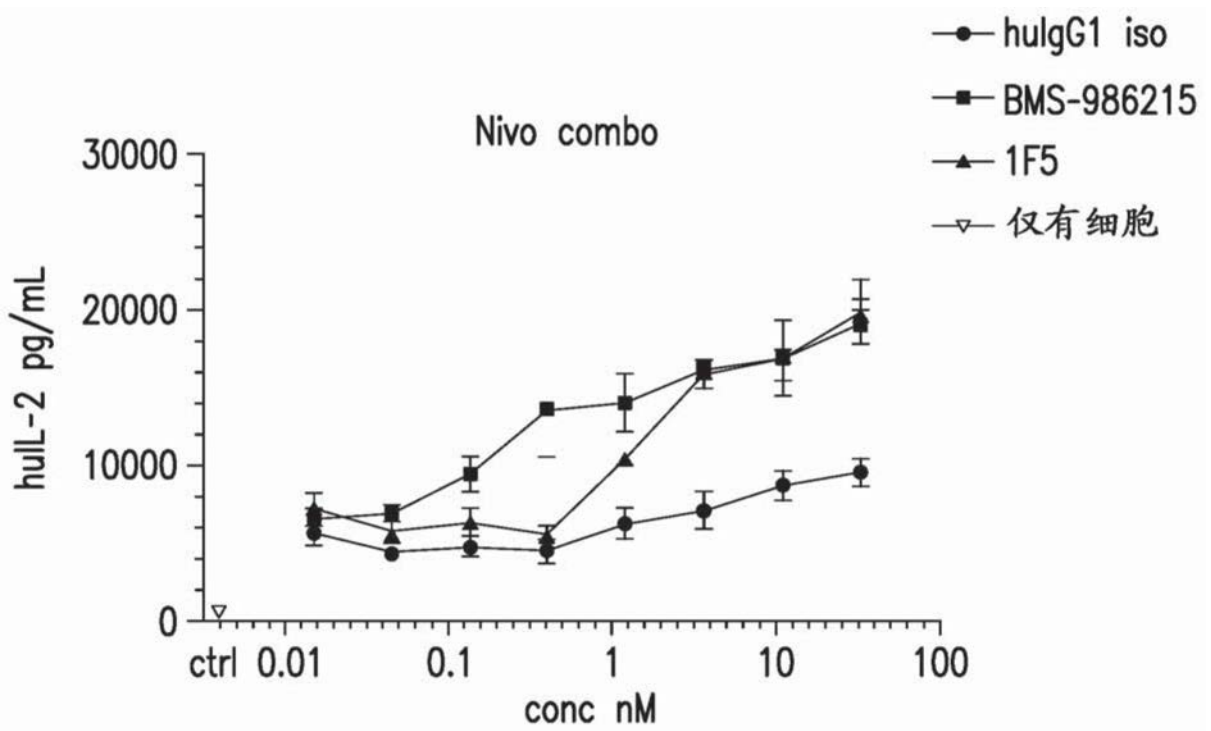


图10E

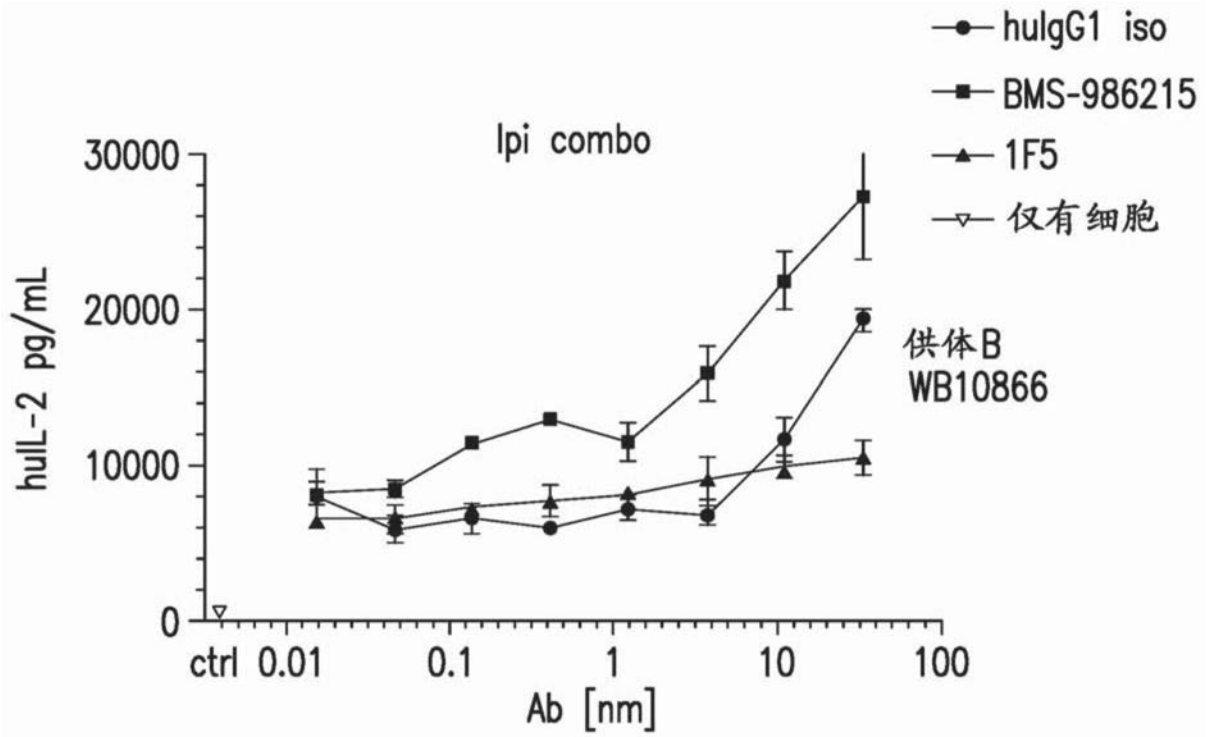


图10F

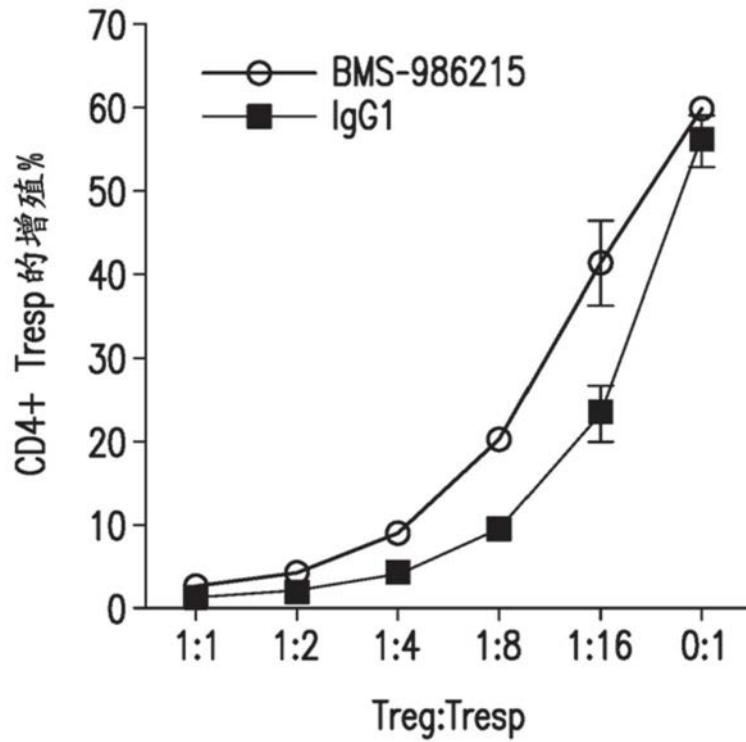


图11A

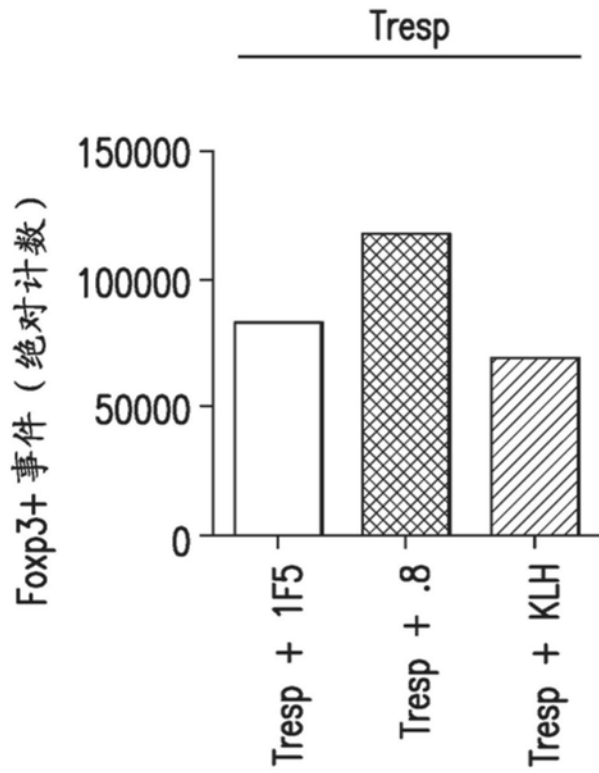


图11B

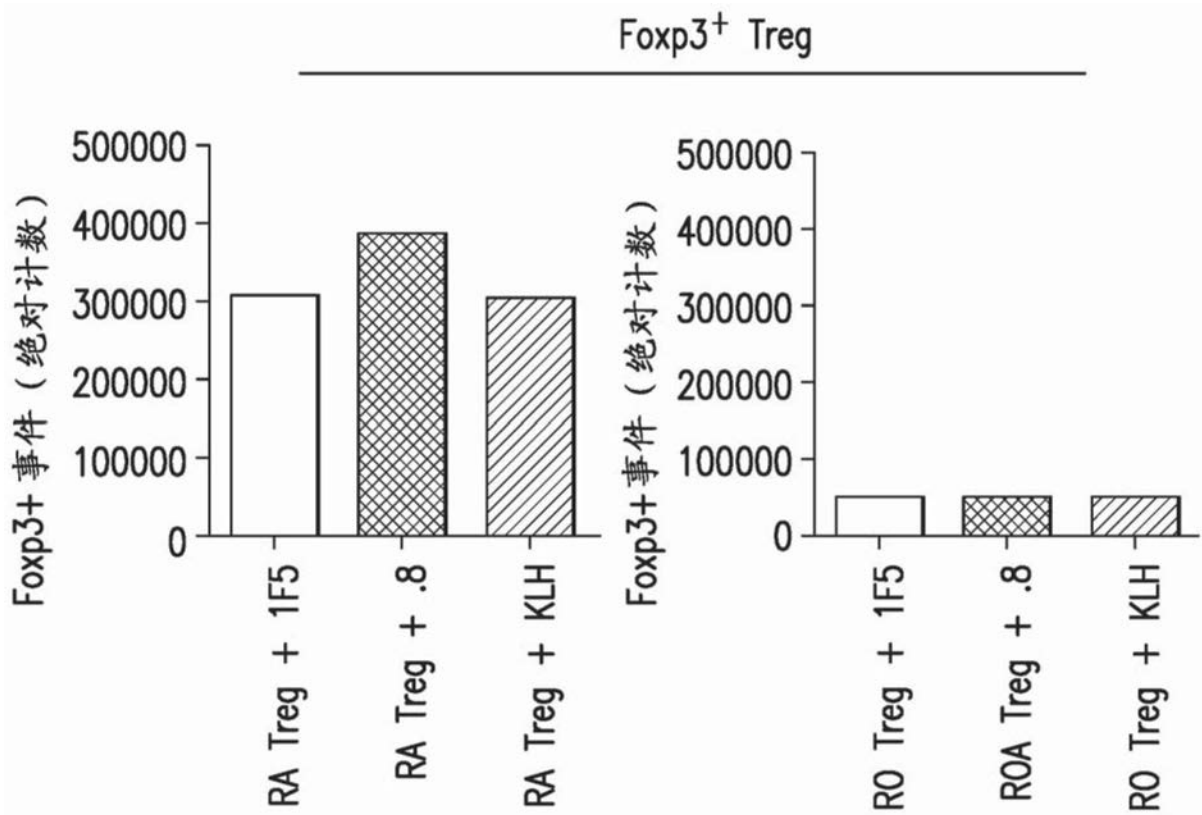


图11C

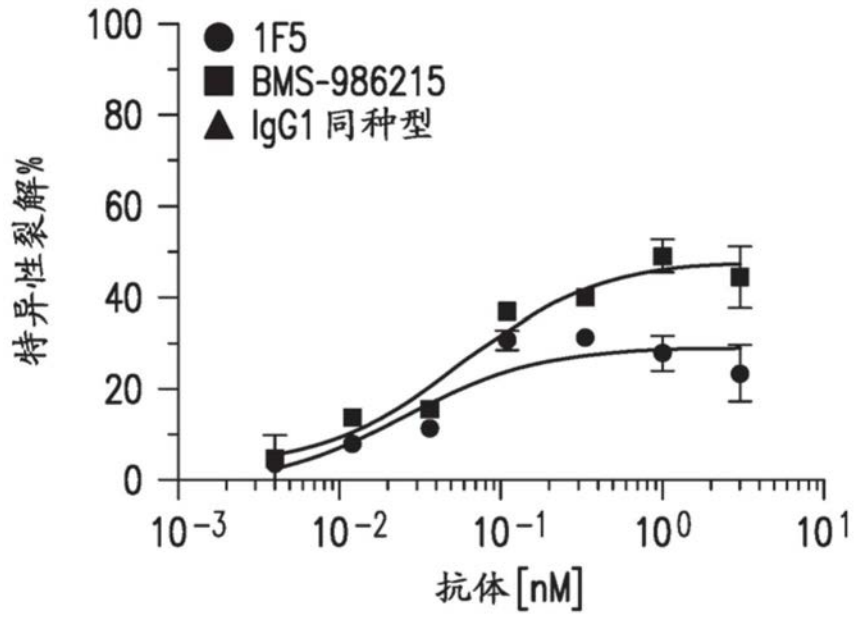


图12A

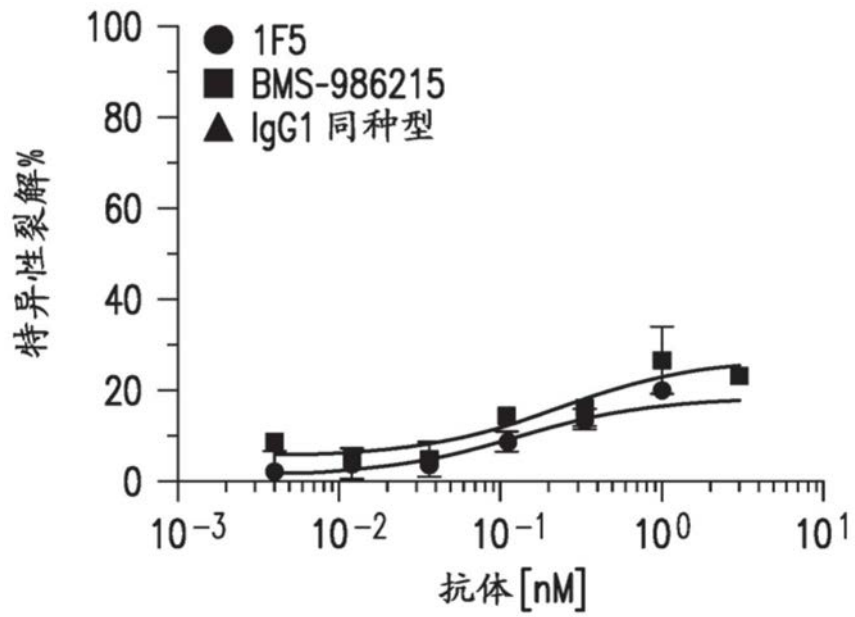


图12B

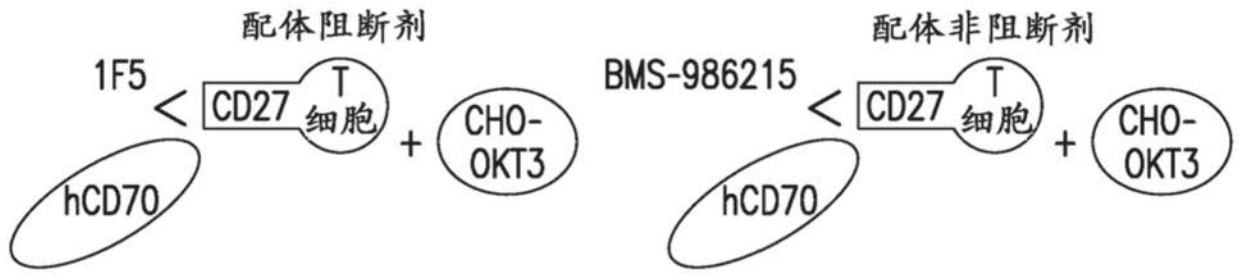


图13A

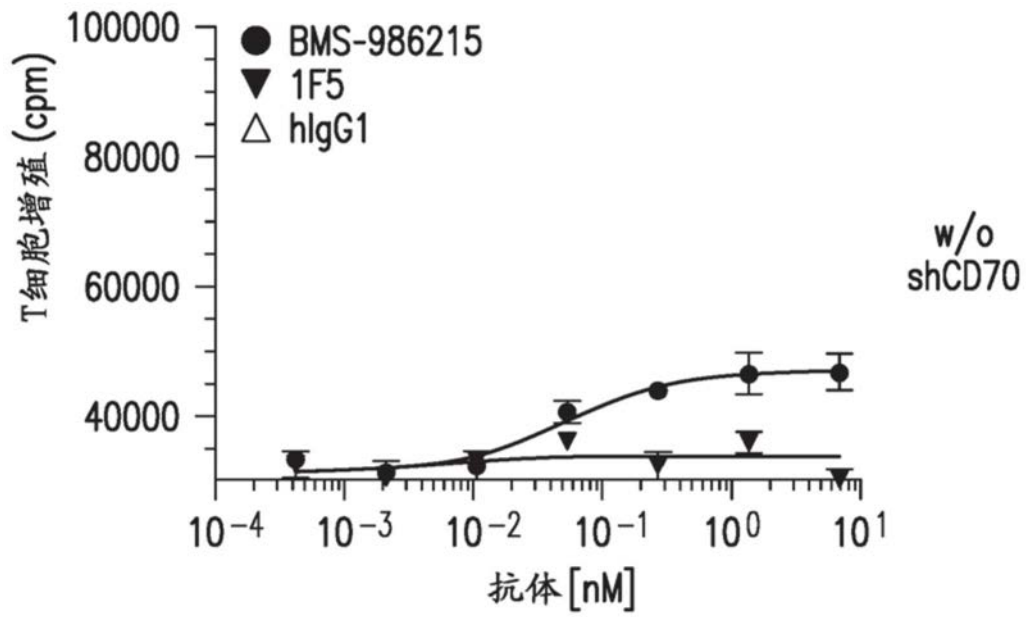


图13B

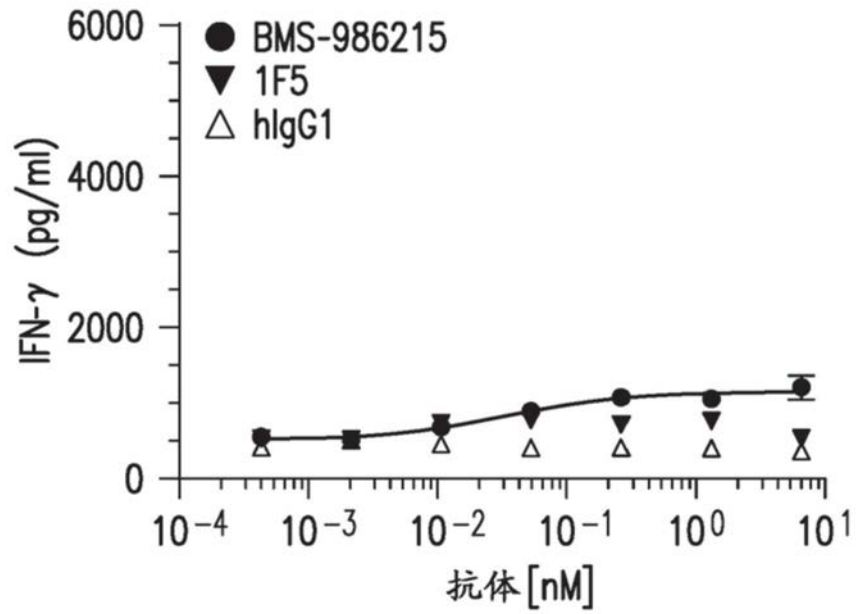


图13C

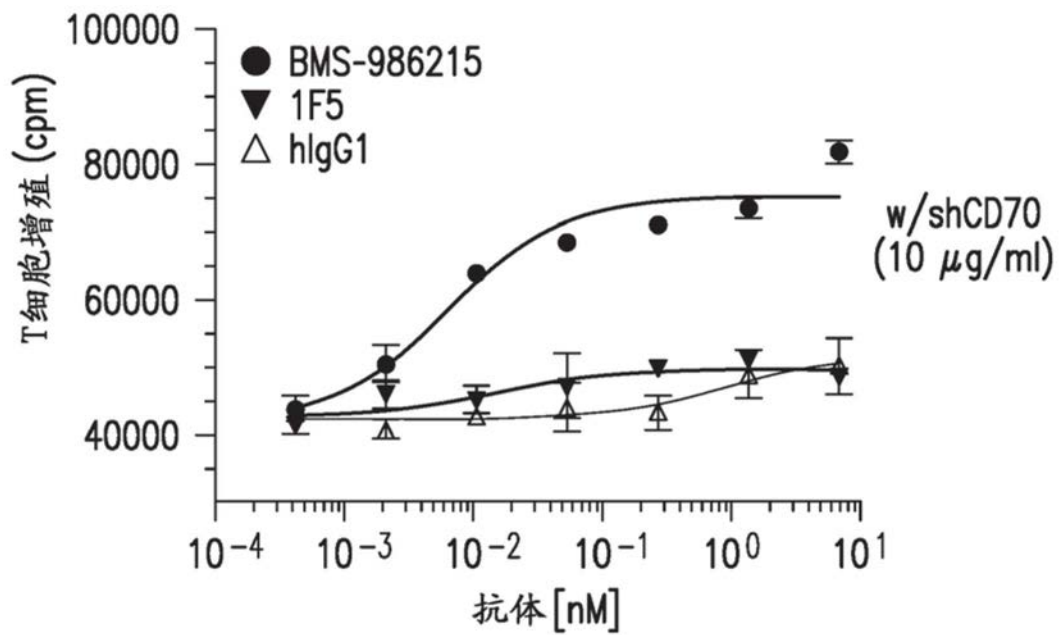


图13D

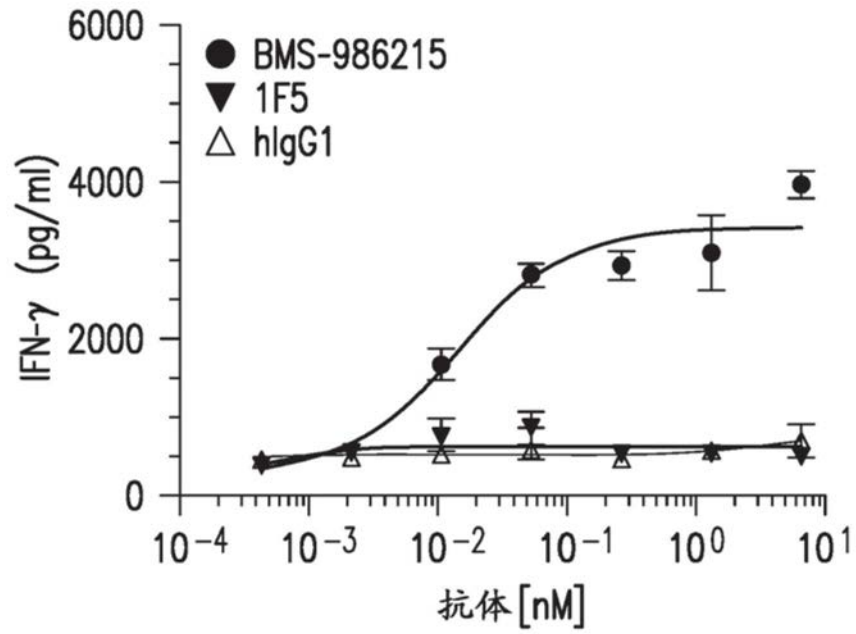


图13E

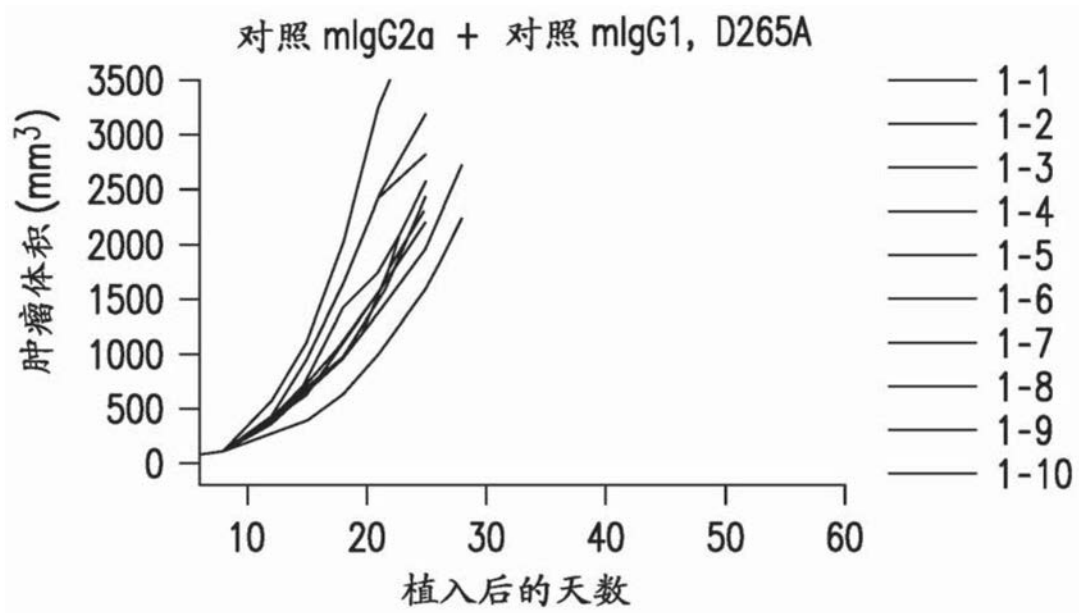


图14A

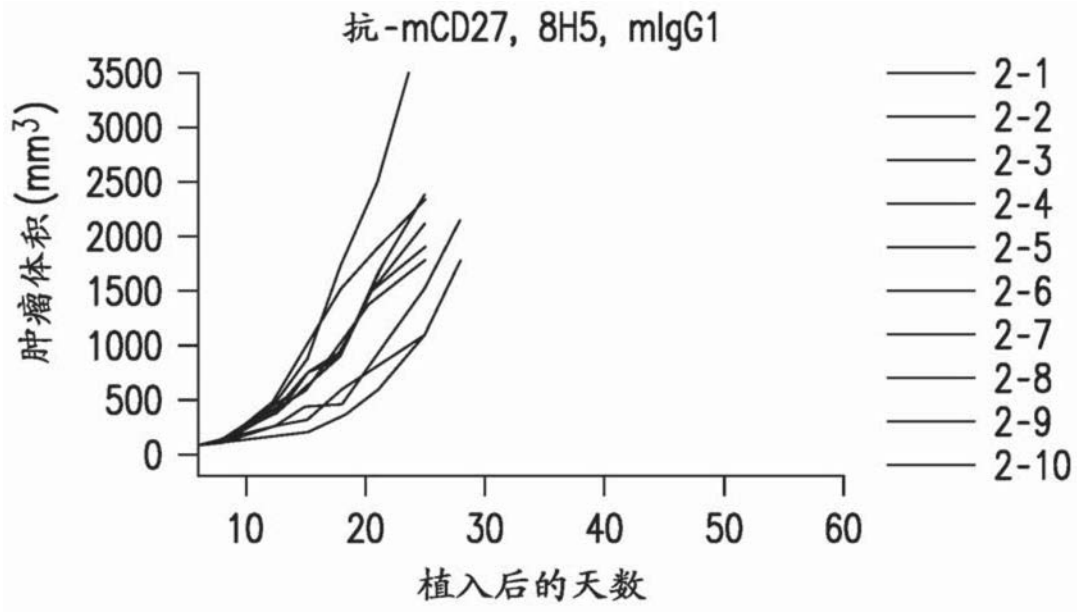


图14B

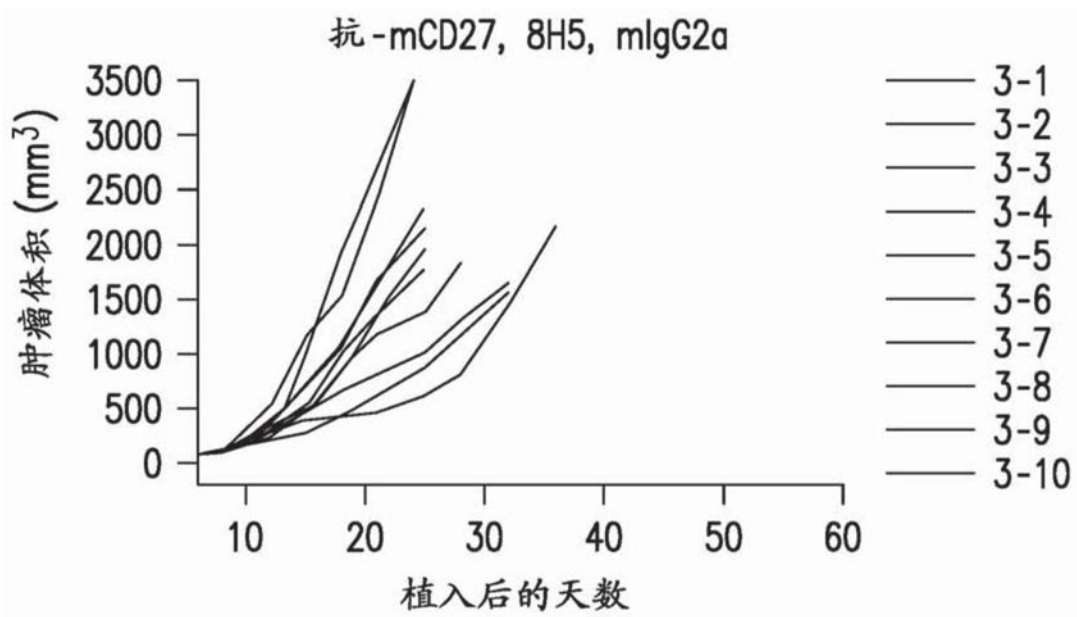


图14C

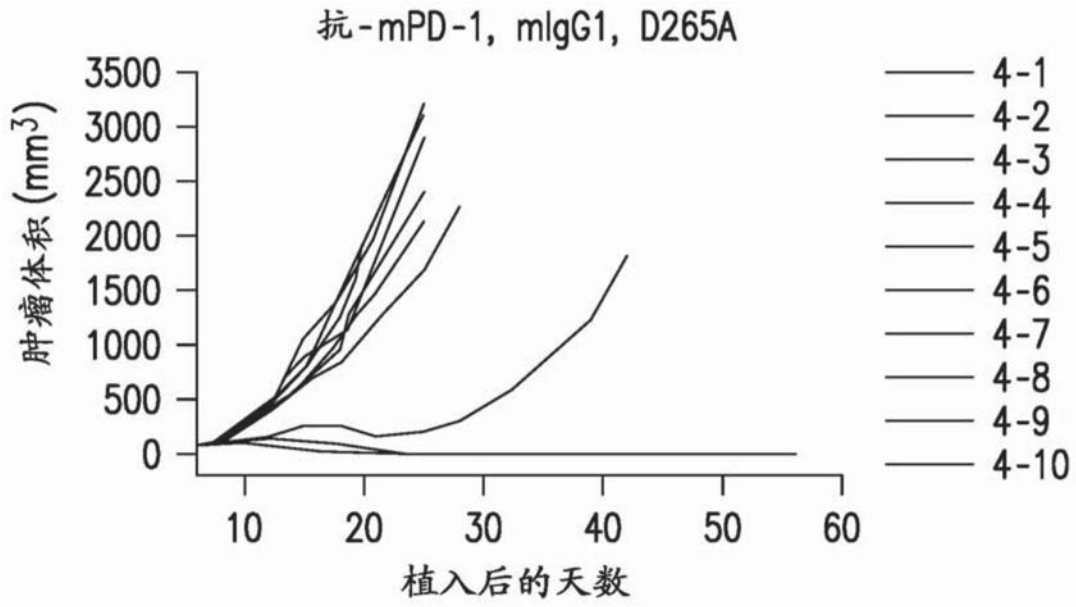


图14D

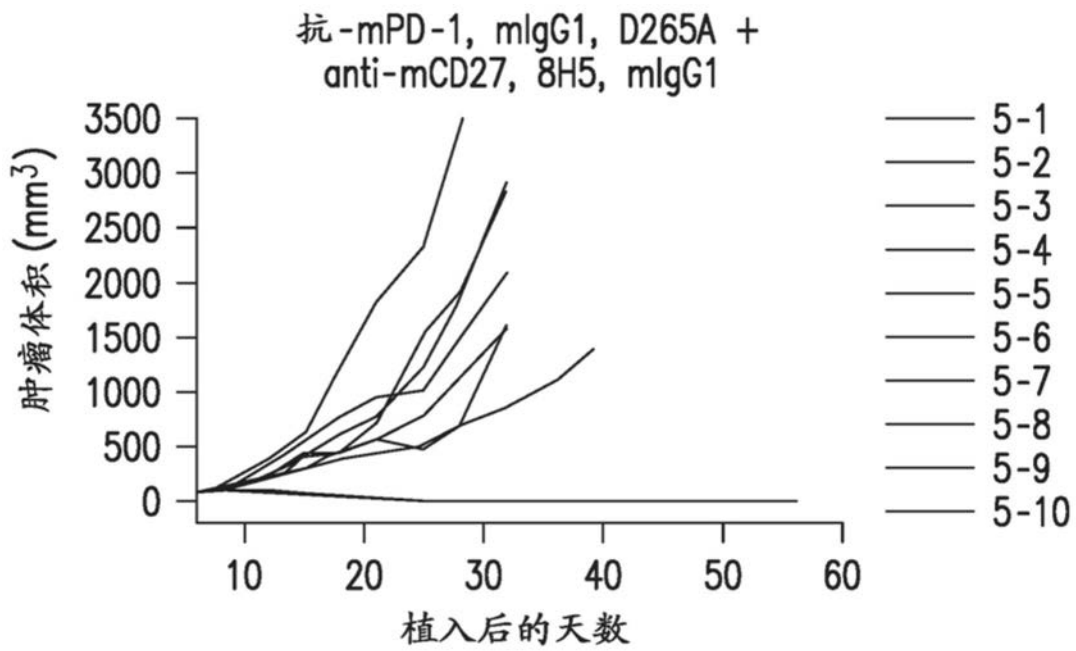


图14E

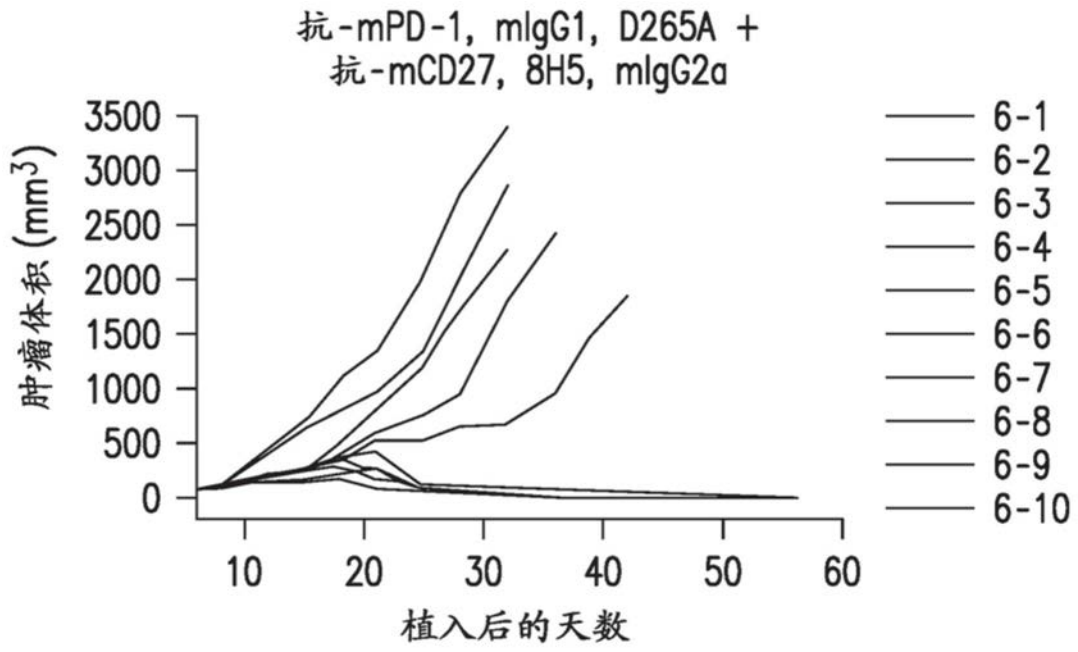


图14F